

Aus der  
Anatomischen Anstalt der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Lehrstuhl II (Komm.Vorstand: Prof. Dr. Dr. U. Welsch)

**Nachweis von antimikrobiellen Peptiden  
in den Epithelien von Atemwegen,  
Gastrointestinaltrakt, Urogenitalorganen,  
Reproduktionsorganen und Haut  
bei Rhesusaffe (*Macaca mulatta*) und Mensch**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Christiane Lang  
aus München

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. U. Welsch

Mitberichterstatter: Prof. Dr. S. Hammerschmidt

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Dr. R. Bals

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 06.12.2007

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>3</b>
<b>1.EINLEITUNG.....</b>	<b>4</b>
1.1. ÜBERSICHT.....	4
1.2.STRUKTUR, NOMENKLATUR UND VORKOMMEN ANTIMIKROBIELLER PEPTIDE .....	5
1.3. FUNKTIONEN ANTIMIKROBIELLER PEPTIDE .....	10
1.3.1. ANTIMIKROBIELLE AKTIVITÄT.....	10
1.3.2. NICHTANTIMIKROBIELLE FUNKTIONEN.....	13
1.4. ROLLE BEI KRANKHEITEN.....	14
<b>2. FRAGESTELLUNG.....</b>	<b>17</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>18</b>
3.1. HERKUNFT DES GEWEBES.....	18
3.2. GENERIERUNG DER ANTIKÖRPER.....	18
3.3. IMMUNHISTOCHEMIE.....	19
3.4. AUSWERTUNG.....	20
<b>4. ERGEBNISSE.....</b>	<b>21</b>
4.1. ORTE DER EXPRESSION ANTIMIKROBIELLER PEPTIDE BEIM ..... RHESUSAFFEN.....	21 21
4.2. ORTE DER EXPRESSION ANTIMIKROBIELLER PEPTIDE BEIM MENSCHEN.....	41
<b>5. DISKUSSION.....</b>	<b>76</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>89</b>
<b>7. LITERATUR.....</b>	<b>90</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Übersicht

Ziel dieser Arbeit ist es, die humanen  $\beta$ -Defensine 1 und 2 (hBD-1 und hBD-2) sowie das Cathelicidin LL-37 bei Rhesusaffe und Mensch durch indirekte Immunhistochemie in verschiedenen Geweben sichtbar zu machen und auf diesem Wege eventuell neue Hinweise auf deren mögliche Funktion zu finden.

Antimikrobielle Peptide sind Effektormoleküle der angeborenen Immunität (Ganz und Lehrer, 1994). Sie werden auch „Peptidantibiotika“ genannt.

Sie haben neben einer direkt antimikrobiellen Funktion bei der Abwehr an Körperoberflächen multiple andere Funktionen, beispielsweise als Entzündungsmediatoren oder bei der Beeinflussung anderer Prozesse wie Zellproliferation und Wundheilung.

Chemisch gesehen können Peptidantibiotika in drei Hauptklassen eingeteilt werden (Martin et al., 1995). Die Ähnlichkeiten in der Sequenz sind innerhalb jeder Gruppe fast vernachlässigbar. Eher bildet die 3D-Struktur die Grundlage für die Gruppierung.

Die erste Gruppe bilden lineare,  $\alpha$ -helicale Peptide ohne Cystein. Sie umfasst die Cecropine, das Magainin, die Bombinine und die kleineren Temporine.

Die zweite Gruppe besteht aus Peptiden mit einer geraden Anzahl von Cysteinen, die durch Disulfidbrücken untereinander verbunden sind. Die Anzahl dieser Bindungen kann von einer bis vier variieren. Peptide mit einem Disulfid, welches eine C-terminale Schleife bildet, werden hauptsächlich in den Hautsekreten von Fröschen gefunden, z.B. Brevinine, Esculentine.

Beispiele von Peptiden mit zwei Disulfidbrücken sind die Tachyplesine von Krabben und die Protegrine der Schweine (Lehrer et al., 1998). Die am besten untersuchte Untergruppe in der Cystein enthaltenden Gruppe sind die Defensine der Säugetiere mit drei S-S-Bindungen.

Die dritte Gruppe bilden Peptide mit einem ungewöhnlich hohen Anteil an ein oder zwei Aminosäuren, am häufigsten Pro und Arg zusammen. Das PR-39 vom Schwein ist multifunktionell, mit einer guten antibiotischen Aktivität, einer Wundheilungsfunktion und einer antioxidativen Funktion (Gallo et al., 1994). Es gibt größere Verwandte von PR-39 namens Bac5 und Bac7 vom Rind. Vom Rind wird auch Indolicidin gebildet, ein 13 Aminosäuren langes Peptid mit fünf Trp-Resten. Auch das hier untersuchte menschliche Cathelicidin LL-37 gehört zu dieser Gruppe.

## 1.2. Struktur, Nomenklatur und Vorkommen antimikrobieller

### Peptide

Antimikrobielle Peptide, welche sechs Cysteine enthalten, wurden als Defensine klassifiziert. Es gibt wenigstens drei strukturelle Gruppen, deren entwicklungsgeschichtliches Verhältnis zueinander nicht ganz klar ist (Ganz und Lehrer, 1995): Die ursprünglich beschriebenen klassischen  $\alpha$ -Defensine (z.B. humane neutrophile Peptide), die später entdeckten  $\beta$ -Defensine, und die bei Insekten strukturell ähnlichen Peptide, die Insektendefensine genannt werden. Sie unterscheiden sich in Abstand und Verbindung ihrer sechs Cysteine und wirken antimikrobiell gegen grampositive und gramnegative Bakterien (Kogan et al., 1994), Pilze (Selsted et al., 1984; Segal et al., 1985) und bestimmte Viren mit Hülle (Lehrer et al., 1985; Daher et al., 1986).

Alle menschlichen Defensingene wurden auf Chromosom 8p23 lokalisiert, was frühere Schlüsse bestätigt, dass die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Defensingene einen gemeinsamen entwicklungsgeschichtlichen Ursprung haben (Liu et al., 1997; Liu et al., 1998).

Alle Wirbeltierdefensine sind 29-40 Aminosäuren lange kationische Peptide, die sechs über Disulfidbrücken verbundene Cysteine enthalten. Die sechs Cysteine von  $\alpha$ -Defensinen sind 1-6, 2-4 und 3-5- disulfidverbunden, in  $\beta$ -Defensinen hingegen sind sie 1-5, 2-4 und 3-6-verbunden. Obwohl  $\alpha$ - und  $\beta$ -Defensine sehr ähnliche Molekülkonformationen annehmen (Zimmermann et al., 1995), beruht ihr Mangel an Ähnlichkeit auf Genebene, cDNA und Präpropeptidsequenzen auf entweder funktionsbedingter struktureller Konvergenz oder auf entwicklungsgeschichtlicher Divergenz aus einem entfernten gemeinsamen Vorläufer (Liu et al., 1997).

Mitglieder der wichtigsten antimikrobiellen Peptidfamilien werden zunächst als Präproproteine translatiert, die eine Signalsequenz (Vorstück) enthalten, und eine zusätzliche Proregion, welche im reifen Peptid nicht vorkommen. Eine posttranslationale proteolytische Bearbeitung ist nötig, um diese Vorläuferpeptide in ihre reife Form zu überführen. Während oder sofort nach der Translation wird die  $\text{NH}_2$ -terminale Signalsequenz rasch entfernt. Im Folgenden wird das resultierende Proprotein über mehrere Stunden zum  $\text{COOH}$ -terminalen reifen Peptid zerlegt.

## **$\alpha$ - Defensine**

Klassische Defensine bilden eine dreifach-gefaltete  $\beta$ -Blatt-Struktur, die durch eine Schleife mit einem  $\beta$ -Haarnadel-förmigen hydrophoben Finger verbunden ist, eine Konformation, die einer gebogenen Büroklammer ähnelt.

$\alpha$ -Defensine werden zunächst als 94 Aminosäuren langes Vorläuferprotein gebildet, aus dem durch Abspaltung eines Signalpeptides ein 75 Aminosäuren langes Prodefensin wird. Der größte Teil des Prodefensins wird im Knochenmark zu 56 Aminosäuren langen Zwischenstufen verarbeitet und dann in peripheren Neutrophilen im Blut in reife Defensine umgewandelt (Nakazato et al., 1995).

Die Gene, welche klassische Defensine codieren, sind durch außerordentliche Vielfalt und schnelle Evolution der Sequenzen, welche das reife Protein codieren, gekennzeichnet (Jones und Bevins, 1992; Nagaoka et al., 1992; Linzmeier et al., 1993; Huttner et al., 1994).

Die menschlichen  $\alpha$ -Defensine, HNP-1-4, werden in den azurophilen Granula phagozytischer Leukozyten gespeichert, welche eine Rolle bei der Abtötung inkorporierter Mikroorganismen spielen (Ganz und Lehrer, 1994), während die  $\alpha$ -Defensine HD-5 und HD-6 in den Epithelien des Dünndarms exprimiert werden (Jones und Bevins, 1993; Jones und Bevins, 1992).

Alle bekannten Gene, die menschliche  $\alpha$ -Defensine kodieren, sind in Region 8p21-pter lokalisiert (Palfree et al., 1993; Sparkes et al., 1989).

## **$\beta$ -Defensine**

$\beta$ -Defensine sind kleine, cysteinreiche, kationische Peptide, welche von vielen Epithelien exprimiert werden.  $\beta$ -Defensine wurden unter anderem zuerst in Rindertrachea (Diamond et al., 1991), Rindergranulozyten (BNBD 1-13, bovine neutrophile  $\beta$ -defensins) (Selsted et al., 1993) und Hühnerleukozyten (Gallinacin, GAL 1a, GAL1, GAL2) (Harwig et al., 1994) gefunden.

### **$\beta$ -Defensin 1**

Das humane  $\beta$ -Defensin 1 ist ein kurzes Peptid aus 36 Aminosäuren. Es enthält sechs Cysteine, die intramolekulare Disulfidbrücken bilden. Das Molekulargewicht beträgt 3928,6 Da (Bensch et al., 1995).

Bei einer systemischen Untersuchung der Peptide aus Hämofiltrat wurde das Peptid hBD-1, ein Homologes der  $\beta$ -Defensine, isoliert (Bensch et al., 1995). Es hat mit den  $\beta$ -Defensinen aus Rinderneutrophilen, TAP aus Rindertrachea und Gallinacin aus Hühnern

einige charakteristische Eigenschaften gemeinsam (Bensch et al., 1995). Die Sequenzanalyse des nativen hBD-1 ergab eine Peptidsequenz von 36 Aminosäuren. Die Positionen 5, 12, 17, 27, 34 und 35 zeigten keine PTH (Phenylthiohydantoin)-Aminosäure und es wurde angenommen, sie enthielten Cysteine, welche durch eine normale Edman-Reaktion nicht gefunden werden können. Alle Aminosäuren wurden an den vermuteten Positionen bestimmt (Bensch et al., 1995). Für das native Peptid wurde mit Hilfe von Massenspektroskopie ein Molekulargewicht von 3928  $\pm$  0,5 Da bestimmt, für das reduzierte und alkylierte Peptid 4276  $\pm$  0,6 Da. Die Differenz von 348 Da ist begründet durch das Hinzufügen von 6 Carboxamidomethylengruppen  $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$  (58Da) an die 6 Cysteine im hBD-1.

Ein Vergleich ergab, dass dieses neue Peptid eine hohe Homologie mit  $\beta$ -Defensinen aus Rinderneutrophilen (BNBD 1-13), trachealem antimikrobiellen Peptid (TAP) vom Rind und Gallinacinen aus Hühnerleukozyten aufweist. Sie enthalten ein hochkonserviertes Muster von neun Aminosäuren, welche das Kernmuster der  $\beta$ -Defensine darstellen (Harwig et al., 1994).

Das hBD-1-Gen wurde isoliert, geklont und innerhalb von 150 kb des  $\alpha$ -Defensin-Clusters auf Chromosom 8p23.1-p23.2 lokalisiert (Liu et al., 1997).

Für hBD-1 konnte die kodierende Sequenz in voller Länge aus Atemwegsepithel geklont werden. Weitere Analysen zeigten, dass hBD-1 in den großen Atemwegen in größerer Menge vorkam als in den Gasaustauschregionen der menschlichen Lunge (McCray und Bentley, 1997).

### **$\beta$ -Defensin 2**

Ein zweites menschliches  $\beta$ -Defensin-Gen, hBD-2, wurde geklont und seine Struktur und Exprimierung in entzündeten Gewebeschnitten untersucht (Liu et al., 1998; Harder et al., 1997). Das gesamte Gen umfaßt etwa 2 kb mit zwei kleinen Exons und einem Intron.

Im Gegensatz zum anderen epithelialen  $\beta$ -Defensin-Gen, hBD-1, enthält das hBD-2-Gen einige Bindungsstellen für den nuclear factor  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ), welcher in die Transkriptionsantworten auf LPS und proinflammatorische Cytokine involviert ist (Shi et al., 1998). NF- $\kappa\text{B}$  wirkt bekanntermaßen als potentes Antwortelement auf TNF und integriert wahrscheinlich Informationen der angeborenen und adaptierten Immunsignalpfade als Antwort auf Verletzung oder Invasion durch Mikroorganismen.

Das Fehlen ähnlicher NF- $\kappa\text{B}$ -Elemente beim hBD-1-Gen könnte erklären, warum die hBD-1-Synthese nicht durch LPS und TNF induziert wird (Liu et al., 1998).

Der Abstand zwischen dem hBD-2-Gen und den anderen Defensingenen ist viel größer als die typischen Abstände zwischen anderen Defensingenen, was nahelegt, dass in dieser Region eventuell noch andere Defensingene identifiziert werden könnten.

HBD-2 wurde zudem im Epithel der menschlichen Atemwege und in sezernierter Form auf deren Oberfläche nachgewiesen (Bals et al., 1998).

### **Cathelicidine**

Die Cathelicidine sind eine weitere Familie antimikrobieller Peptide (Zanetti et al., 1995; Agerberth et al., 1995; Ritonja et al., 1989).

Sie werden aus Vorläuferproteinen durch Proteolyse hergestellt und sind gekennzeichnet durch eine nahezu unveränderliche N-terminale Region und eine stark variable C-terminale Region.

Das erste menschliche Cathelicidin ("cathelin"), LL-37/ hCAP-18, wurde aus cDNA geklont, die aus menschlichem Knochenmark isoliert wurde (Agerberth et al., 1995; Larrick et al., 1995).

Es handelt sich um ein 30 kDa schweres alphahelikales Peptid mit einer herkömmlichen 30-Aminosäuren-Signalsequenz und zwei Domänen: Ein zu anderen bekannten Mitgliedern der CAP-18-Familie hoch homologes Aminoende (14 kDa) und ein weniger homologes endotoxinbindendes Carboxylende.

Cathelicidine wurden in mehreren Säugetierarten nachgewiesen, einschließlich Schwein, Rind, Schaf, Kaninchen und Mensch (Zanetti et al., 1995; Agerberth et al., 1995). Der hohe Grad an Konservierung ihrer Cathelindomäne legt nahe, dass die Mitglieder dieser Familie sich durch Duplikation und Modifikation aus einem gemeinsamen Vorläufergen entwickelten (Zanetti et al., 1995).

Nach dem Vorbild des konservierten Cathelinteils wurde ein cDNA-Klon aus menschlichem Knochenmark isoliert, der ein antibakterielles Peptid namens FA-LL-39 kodiert, ein 39-Reste-Peptid, dessen N-terminale Sequenz FA-LL ist und FA-LL-39 benannt wurde (Agerberth et al., 1995). Dieser menschliche Cathelinvorläufer wurde im Knochenmark und im Hoden exprimiert, aber nicht in 15 anderen getesteten menschlichen Geweben. Über eine cDNA für Präpro-FA-LL-39 wurde später von zwei anderen Gruppen berichtet, welche den Namen CAP-18 benutzten (Larrick et al., 1995).



PR 39 und FA-LL-39 wurden an entsprechenden Stellen des Chromosom 13 beim Schwein und Chromosom 3 beim Menschen gefunden. Im Folgenden wurde das komplette menschliche Gen für FA-LL-39 sequenziert.

Der Einfluss der Ionenzusammensetzung, des pH-Wertes und der Peptidkonzentration auf die Konformation und Aktivität von LL-37 wurde von Johansson, Gudmundsson und Kollegen beschrieben (Johansson et al., 1998).

LL 37/hCAP-18 kommt in den Epithelien einer Reihe Organe vor. Eine frühere RNA-Hybridisierungsstudie wies LL-37/hCAP-18 hauptsächlich in Testis und Knochenmark nach (Agerberth et al., 1995). Techniken der in situ-Hybridisierung und Immunzytochemie wiesen LL-37/hCAP-18 auch in entzündeten menschlichen Epidermiszellen nach (Frohm et al., 1997). In einer anderen Studie wurden mRNAs untersucht, die aus mehr als 50 menschlichen Organen mit Hilfe der Dot-Blot-Hybridisierungstechnik isoliert wurden (Bals et al., 1998).

LL-37/hCAP-18-RNA wurde durch in-situ-Hybridisierung verstreut im ganzen Epithel sowohl des oberen Gastrointestinaltraktes, einschließlich des Magens und des Duodenums, als auch des unteren Gastrointestinaltrakts, gefunden. RNA-Hybridisierungsexperimente zeigten die Exprimierung von LL-37/hCAP-18 auch in Trachea und Lunge. Die Exprimierung von LL-37/hCAP-18 in Epithelzellen des Respirationstraktes wurde durch RT-PCR in Experimenten bestätigt. Es wurden weitere Versuche durchgeführt, um die Zelltypen in den Drüsen der Atemwege zu identifizieren, die LL37/hCAP-18 exprimieren. Die serösen Tubuli sind der distalste Teil der Drüsen, welcher Proteine und Peptide, einschließlich Lysozym und Lactoferrin, sezernierende Zellen enthält. Die proximaleren mukösen Tubuli haben größere sekretorische Granula, die hauptsächlich aus Muzinen bestehen. Der Ausführungsgang der Drüse entleert das Sekret in das Lumen der Atemwegsoberfläche. In-situ-Hybridisierungsversuche wurden für Lysozym zusammen mit Immunzytochemie durchgeführt, um die serösen Tubuli spezifisch zu markieren. Sowohl in den serösen als auch mukösen Zellen der submukösen Drüsen wurde eine Exprimierung von LL-37/hCAP-18 festgestellt. Die Exprimierung von LL37/hCAP-18 im Oberflächenepithel der distalen Atemwege war deutlich vermindert. Eine ähnliche Verteilung der LL37/hCAP-18-mRNA-Exprimierung wurde in Lungengeweben gefunden, die von CF-Patienten oder von menschlichen Xenotransplantaten stammten. In der Oberflächenflüssigkeit von Xenotransplantaten wurde eine Bande mit einem Gewicht von ca. 4,5 kDa entdeckt, während in aus menschlicher Lunge gewonnener Flüssigkeit zwei Formen des Peptids gefunden wurden, sowohl die reife Form von ca. 4,5 kDa Gewicht, als auch eine wesentlich größere Version, die möglicherweise den unbearbeiteten Vorläufer darstellt (Bals et al., 1998).

## 1.3. Funktionen antimikrobieller Peptide

### 1.3.1. Antimikrobielle Aktivität

Sowohl die von Amphibien gebildeten Magainine als auch Insektenpeptide (z.B. Cecropine) werden durch Verletzung induziert, und diese Peptidinduktion ist möglicherweise ein primitives Äquivalent der Immunantwort höherer Wirbeltiere. Die Gentranskription für bestimmte Insektenpeptide wird durch Gen-Sequenzen kontrolliert, welche auch die Expression menschlicher Antikörper regulieren (Hancock, 1997). Selbst ursprüngliche Organismen wie Bakterien und Pilze benutzen kationische Peptide (z.B. Lantibiotika und Bacteriocine) als selektiv antimikrobielle Substanzen. Kationische Peptide wurden in allen Lebensformen von der Bakterie bis zum Menschen gefunden und sind ein konservatives Element im Kampf gegen aggressive Mikroorganismen. Bis auf Nisin, ein Lantibiotikum (Kolter und Moreno, 1992), welches ein Produkt der natürlichen Fermentation von *Lactococcus lactis* ist, haben sich natürliche Quellen als nicht verwertbar für die Peptidproduktion in großer Menge erwiesen.

Cecropine, Magainine und Defensine sind allesamt kationische und membranaktive Peptide, und vermutlich beruht ihre antimikrobielle Aktivität auf ihrer Fähigkeit, selektiv Membranen zu zerstören, wahrscheinlich durch Kanalbildung (Kagan et al., 1990).

Kationische Peptide haben nur selten die außergewöhnlich hohe antimikrobielle Aktivität, wie sie bei einigen konventionellen Antibiotika gegen ausgewählte Bakterien gesehen wird (Piers et al., 1994). Sie haben minimale Hemmkonzentrationen in der Größenordnung von 1-8 µg/ml, vergleichbar denen der potentesten Antibiotika gegen resistente Bakterien (z.B. *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*) und hoch antibiotikaresistente Stämme wie methicillinresistente *Staphylococcus aureus*, vancomycinresistente Enterokokken, *Escherichia coli*, die mit erweitertem Spektrum  $\beta$ -Lactamase produzieren sowie multi-antibiotika-resistente gramnegative Bakterien. Die minimalen Hemmkonzentrationen gegen klinisch antibiotikaresistente und klinisch empfindliche Stämme einer gegebenen Art variieren nicht enorm, und kationische Peptide können Aktivität sowohl gegen grampositive als auch gramnegative Bakterien und Pilze besitzen.

Die meisten kationischen Peptide induzieren nur selten resistente Mutanten, selbst nach 20 Durchgängen einer Antibiotikakonzentration nahe der minimalen Hemmkonzentration (Hancock, 1997). Diese Peptide töten Bakterien viel schneller ab als konventionelle Antibiotika, was ihrem physikalischen Wirkmechanismus zugeschrieben wird.

Es gibt einige natürlich resistente Bakterien, zwei Beispiele sind *Burkholderia cepacia* und *Serratia marcescens*, deren Resistenz vermutlich auf einer nicht-interaktiven äußeren Membran und der Produktion spezifischer Proteasen beruht. Einige Peptide binden an Lipopolysaccharide und haben so Antiendotoxineigenschaften (Piers et al., 1994; Gough et al., 1996).

Die Aktivität und Selektivität kationischer Peptide werden durch die Interaktionsart mit bakteriellen Zellmembranen bestimmt. Bei grampositiven Bakterien ist nur eine (nämlich die zytoplasmatische) Membran beteiligt, bei gramnegativen Bakterien die äußere und die zytoplasmatische Membran (Hancock, 1997). Kationische Peptide interagieren mit Lipopolysacchariden auf der Oberfläche gramnegativer Bakterien und werden teilweise über den selbstvermittelten Aufnahmeweg inkorporiert (Hancock et al., 1995; Piers et al., 1994; Falla et al., 1996).

Das entscheidende Ereignis bei der Abtötung, sowohl bei gramnegativen als auch grampositiven Bakterien, ist die Kanalformation in der Zytoplasmamembran (Hancock et al., 1995; Falla et al., 1996).

Die Fähigkeit zur Kanalbildung wird durch die hohen transmembranösen Potenziale, einen hohen Anteil negativ geladener Lipide und das Fehlen von kationischen Peptiden und Cholesterin, Eigenschaften, die für Bakterien charakteristisch sind, gefördert. Eukaryotische Zellen hingegen haben niedrige Membranpotenziale, einen hohen Cholesterinanteil und einen geringen Anteil anionischer Komponenten. Auf diesen Membranunterschieden beruht die Selektivität dieser Peptide gegen Bakterien (Hancock, 1997).

Wirksames Bereitstellen von  $\alpha$ -Defensinen gegen mikrobielle Ziele erfolgt nach der Phagocytose, wenn die Phagosomen und azurophilen Granula im Zytoplasma der Neutrophilen fusionieren (Martin et al., 1995). Da die Phagosomenmembran dem inkorporierten Mikrobium oft eng anliegt, sind fusionierte Granulainhalte nur leicht verdünnt, und an der mikrobiellen Oberfläche entstehen wahrscheinlich hohe lokale Defensinkonzentrationen. Das begünstigt die Defensinmultimerisierung in der Zielzellmembran, wie auch Interaktionen zwischen Defensinen und anderen Abwehrmolekülen, welche in die Phagosomen freigesetzt werden. Nur ein kleiner Anteil des Defensins wird ins externe Milieu sezerniert (Ganz, 1987).

Die Panethschen Körnerzellen setzen ihre Granulainhalte, einschließlich der  $\alpha$ -Defensine, in das enge Lumen der intestinalen Krypten frei, nachdem sie durch cholinerge

Substanzen oder mikrobielle Produkte stimuliert wurden (Satoh, 1988; Satoh et al., 1989; Satoh et al., 1992; Eisenhauer et al., 1992; Selsted et al., 1992; Qu et al., 1996).

Während schwerer Infektionen beim Menschen sind die Plasmaspiegel der  $\alpha$ -Defensine (HNP) im Vergleich zu normalen Spiegeln mit einem Anstieg von 40 ng/ml auf 1  $\mu$ g/ml deutlich erhöht (Panyutich et al., 1993; Shiomi et al., 1993).

Valore und Mitarbeiter zeigen, dass die höchsten hBD-1-Konzentrationen im Urin schwangerer Frauen, mittlere Konzentrationen bei nicht schwangeren Frauen und die niedrigsten Konzentrationen bei Männern gefunden wurden (Valore et al., 1998).

Die konstante Expression von hBD-1 in der Urogenitalmukosa (Valore et al., 1998) und die induzierbare Expression von hBD-2 in der Haut stellen spezialisierte Muster der epithelialen Abwehr lokaler mikrobieller Bedrohung dar (Liu et al., 1998).

Rekombinant hergestelltes hBD-2 zeigte nachweisbare bakterizide Tätigkeit gegen eine Reihe gramnegativer und grampositiver Organismen. Die MIC (minimale Hemmkonzentration) für hBD-2 war 62  $\mu$ g/l für *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* und 15  $\mu$ g/ml für *Enterococcus faecalis*, die aus Urin isolierte 44-Aminosäuren-Isoform von hBD-1 hatte gegen *Escherichia coli* D31 eine MIC von 31  $\mu$ g/ml (Bals et al., 1998). Die Aktivität von hBD-2 gegen *E. coli* war von der Natriumchloridkonzentration in der Probe abhängig. Die Fähigkeit von hBD-2, das Wachstum von *E. coli* zu inhibieren, verminderte sich um das achtfache, wenn die Salzkonzentration von 20 mM auf 150 mM erhöht wurde (Bals et al., 1998).

Zusätzliche Experimente wurden durchgeführt, um den potenziellen Synergismus zwischen hBD-2 sowie Lysozym und Lactoferrin, anderen antimikrobiellen Proteinen der menschlichen proximalen Atemwege, zu beurteilen. Für hBD-2 wurden MICs in Anwesenheit nicht-bakteriostatischer Konzentrationen von Lactoferrin und Lysozym gemessen.

Die MICs von hBD-2 gegen *E.coli* und *S.aureus* waren in der Gegenwart von Lactoferrin zwei- bis vierfach vermindert, und auch mit Lysozym wurde gegen *E. coli*, *P. aeruginosa* und *E. faecalis* Synergismus festgestellt.

Eine weitere wichtige Frage ist die relative biologische Aktivität verschiedener antibakterieller Peptide/Proteine, die in der Oberflächenflüssigkeit der Lunge enthalten sind. Es wurde gezeigt, dass die minimale Hemmkonzentration für LL37/hCAP-18 in der Gegenwart von Laktoferrin und Lysozym vermindert ist, was einen Synergismus mit den Proteinen und Peptiden der Oberflächenflüssigkeit nahelegt (Bals et al., 1998). Der

beschriebene Synergismus zeigt auch die Schwierigkeit, von biologischen Versuchen mit gereinigten Proteinen/Peptiden auf ihre relative Funktion *in vivo* zu schließen.

Es konnten nachweisbare Mengen des aktiven, reifen Peptids aus der Oberflächenflüssigkeit der menschlichen Lunge und einem menschlichen bronchialen Xenotransplantat isoliert werden (Bals et al., 1998). Dies unterstützt die Sekretionsversion dieses Peptids in der Abwehr und zeigt, dass der Ursprung des Peptids in der Oberflächenflüssigkeit tatsächlich die Epithelzellen sind.

Es ist weiterhin interessant, dass in der Oberflächenflüssigkeit eine größere Form des Peptids, wahrscheinlich die ungespaltene Form, vorkommt. Diese Entdeckung ist wahrscheinlich ein Hinweis auf eine Verunreinigung durch lysierte Leukozyten.

Wie für die meisten anderen Cathelicidine gilt auch für das menschliche Cathelicidin hCAP-18, dass es intakt als Präpeptid gespeichert wird. Die bakterizide und zytozide Aktivität des Proteins ist an den C-terminalen 37 Aminosäuren lokalisiert, welche fähig sind, eine amphipathische  $\alpha$ -Helix zu bilden (Agerberth et al., 1995; Gudmundsson et al., 1996). Im Allgemeinen muss das cathelinähnliche Segment vom C-terminalen Peptid entfernt werden, um die mikrobizide Aktivität freizusetzen (Scocchi et al., 1992). Vermutlich findet dies während der Degranulation in die Phagozytenvakuole statt, wo Cathelicidine den Proteasen azurophiler Granula, insbesondere Elastase, exponiert sind (Scocchi et al., 1992).

LL-37 und Defensine sind in neutrophilen Granulapopulationen lokalisiert, die sich in Inhalt und Verhalten unterscheiden. Die Lokalisierung von Defensinen in azurophilen Granula ermöglicht es ihnen, in Phagosomen einzudringen, in welchen der potenziell inhibitorische Effekt von NaCl durch ionentransportierende Membranpumpen modifiziert werden könnte oder durch hohe lokale Defensinkonzentrationen überwunden werden könnte. Im Gegensatz hierzu wird LL-37 als Propeptid (hCAP-18) gespeichert und wird in sekretorischen Organellen lokalisiert, den sekundären Granula (Turner et al., 1998). Als Ergebnis treffen extrazelluläre Bakterien (oder freies LPS) auf LL-37 primär in seiner cathelinenthaltenden Vorläuferform (hCAP-18), während inkorporierte Bakterien auf LL-37, die mikrobizide Domäne von hCAP-18, nach proteolytischer Verarbeitung durch Neutrophilenenzyme treffen (Turner et al., 1998).

### 1.3.2. Nichtantimikrobielle Funktionen

Abgesehen von ihrer direkten antimikrobiellen Funktion haben antimikrobielle Peptide multiple Funktionen z.B. als Entzündungsmediatoren oder bei der Beeinflussung

verschiedener anderer Prozesse wie der Zellproliferation, Wundheilung, Zytokinfreisetzung, Chemotaxis und dem Protease-Antiprotease-Gleichgewicht.

Antimikrobielle Peptide weisen eine konzentrationsabhängige Toxizität gegenüber eukaryotischen Zellen auf. Hohe Konzentrationen an  $\alpha$ -Defensin wurden in den Sekreten von Patienten mit Mukoviszidose und chronischer Bronchitis beschrieben, wo diese Substanzen wahrscheinlich zur Entzündungsreaktion beitragen. Sie induzieren die Interleukin-8-Produktion durch Lungenepithelzellen. Der verursachte Zellschaden wird wahrscheinlich durch die defensininduzierte Epithelzelllyse und die Bindung von  $\alpha$ -Defensinen an Protease-Inhibitoren wie  $\alpha$ -1-Antitrypsin verstärkt.

Neben dieser unspezifischen Toxizität binden einige antimikrobielle Peptide in niedriger Konzentration an zelluläre Rezeptoren, aktivieren intrazelluläre Signalwege und stimulieren verschiedene Zellfunktionen.

So binden hBD-1 und hBD-2 beispielsweise an den CCR-6-Rezeptor, der auf unreifen dendritischen Zellen, Gedächtnis-T-Lymphozyten und Mastzellen vorkommt, und bewirken hierdurch Zytokin- und Histaminfreisetzung (Chertov et al., 2000).

LL-37 bindet an den auf Monozyten, Neutrophilen, Mastzellen und Epithel- und Endothelzellen vorkommenden FPRL1-Rezeptor und führt durch Aktivierung dieses mit G-Protein verbundenen Rezeptors z.B. zu Mastzellaktivierung und Chemotaxis. Des Weiteren erfolgt eine Aktivierung des P2X7-Rezeptors (Elssner et al., 2004). LL-37 bindet auch an Apolipoprotein A-I (Wang et al., 1998).

Der Einfluss dieser nichtantimikrobiellen Funktionen auf die Entstehung von Krankheiten ist weitgehend unbekannt.

Aufgrund des breiten Wirkspektrums und des geringen Auftretens von Resistenzen bieten sich antimikrobielle Peptide auch bei der Entwicklung von Medikamenten an. Die spezifische Funktionsweise der Kanalbildung in Membranen macht sie zu einer möglichen neuen Gruppe von Antibiotika mit breitem Einsatzgebiet.

## **1.4. Rolle bei Krankheiten**

Vor ungefähr 10 Jahren wurde berichtet, dass Defensine die Fibrinolyse hemmen und hierbei die Entwicklung der für die verspäteten Hypersensitivitätsreaktionen, einige Vaskulitisformen und die disseminierte intravaskuläre Gerinnung typischen thrombotischen mikrovaskulären Okklusion fördern (Marder et al., 1994).

Von klinischer Bedeutung ist außerdem, dass Patienten, welche Träger von Deletionen im Bereich 8p21-pter, dem Genort einiger hBDs, sind, oft von immer wiederkehrenden Infektionen des oberen Respirationstraktes betroffen sind (Ostergaard und Tommerup, 1989). Bei manchen Patienten wurde dies sogar als Grund für einen frühen Tod angesehen.

Des Weiteren spielen Defensine möglicherweise eine Rolle bei der Entstehung der Atherosklerose. Mit Blick auf Studien, welche eine Verbindung zwischen Entzündung und Atherosklerose nahelegen, und auf die Entdeckung, dass Leukozytendefensin (HNP 2) die Interaktion von Plasminogen und tissue type plasminogen activator mit gezüchteten menschlichen Endothelzellen moduliert, wurde der Effekt dieses Peptids auf die Bindung von Lipoprotein (a) [Lp(a)] an gezüchtete Gefäßendothelien und glatte Muskelzellen von Gefäßen untersucht (Higazi et al., 1997). Defensin (HNP 2) erhöhte die Bindung von Lp(a) an Endothelzellen etwa um das vierfache und an glatte Muskelzellen etwa um das sechsfache. HNP 2 bewirkte einen vergleichbaren Anstieg der von jedem Zelltyp internalisierten Lp(a)-Menge, aber als Konsequenz der Anwesenheit von Defensin internalisiertes Lp (a) wurde nicht abgebaut, was einen deutlichen Anstieg der Gesamtmenge zellassozierten Lipoproteins zur Folge hatte.

Große Defensinmengen wurden im Endothel und in glatten Muskelzellen der Intima atherosklerotischer menschlicher Zerebralarterien gefunden, Regionen, die ebenfalls von Lp(a) durchsetzt sind. Diese Studien legen nahe, dass aus aktivierten Neutrophilen freigesetztes Defensin eventuell zur Lokalisierung und Persistenz von Lp(a) in menschlichen Gefäßen beiträgt und damit zur Atheroskleroseentstehung prädisponiert.

Schließlich existieren noch seltene Granulozytenentwicklungsstörungen mit erniedrigten Defensinkonzentrationen.

Die Transkription von Defensingenen ( $\alpha$  und  $\beta$ ) in Granulozytenvorläufern ist wahrscheinlich relativ kurz und massiv, mit dem Höhepunkt vermutlich im späten Promyelozyten und dem Ende im Myelozyten. Dieser Zeitablauf bei der Transkription der Defensingene wird untermauert durch die Entdeckung von Defensin-mRNA durch in situ-Hybridisierung in Promyelozyten und Myelozyten (Nagaoka et al., 1992), Defensinexprimierung in Zelllinien mit Promyelozytencharakteristika (Daher et al., 1988), durch das Fehlen von Defensin-mRNA in reifen Granulozyten (Daher et al., 1988) und die menschliche Granulozytenreifungsstörung "spezifischer Granulamangel", die vor allem Proteine umfasst, die während des Myelozytenstadiums synthetisiert werden (Johnston et al., 1992). Bei Patienten mit "spezifischer Granuladefizienz", einer seltenen Granulozytenentwicklungsstörung, werden Defensinkonzentrationen im Bereich von 10% des

Normalwertes gefunden (Ganz et al., 1988; Johnston et al., 1992). Bei dieser angeborenen Krankheit ist die Synthese der späten (Myelozyten-)Granulaproteine vermindert oder fehlt ganz, verursacht durch das Fehlen der entsprechenden mRNAs, und betroffene Patienten leiden an häufigen Infektionen durch gewöhnliche Bakterien (Breton Gorius et al., 1980; Boxer et al., 1982; Gallin et al., 1982; Ambruso et al., 1984). Erworbener Defensinmangel wird gelegentlich bei Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie gesehen, seine klinischen Konsequenzen wurden noch nicht untersucht (Borregaard et al., 1993).



## 2. Fragestellung

Antimikrobielle Peptide sind Effektormoleküle mit direkt antimikrobieller Wirkung sowie weiteren Funktionen als Mediatoren. Es ist oft unklar, welche Zellen des Körpers diese antimikrobiellen Peptide produzieren.

Ziel dieser Arbeit ist es, die  $\beta$ -Defensine 1 und 2 sowie das Cathelicidin LL-37 bei Mensch und Rhesusaffe durch indirekte Immunhistochemie in verschiedenen Geweben sichtbar zu machen und auf diesem Wege eventuell neue Hinweise auf deren mögliche Funktion zu finden. Rhesusaffen sind relativ eng mit dem Menschen verwandt und sind daher als Versuchstiere im Rahmen der Erforschung von Krankheitsbildern besonders wertvoll.

## **3. Material und Methoden**

### **3.1. Herkunft des Gewebes**

Alle Gewebeproben des Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) stammen aus dem Primatenzentrum Göttingen (Darmtrakt, Niere, Lunge, Herz, Samenstrang, Trachea, Milz). Sie wurden in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Dann wurden Schnitte von 6 µm Dicke hergestellt und routinemäßig mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt.

Für den Menschen stammen die Gewebeproben von Nasenmuschel, Haut, Magen, CF-Lunge und aus dem Darmtrakt aus der chirurgischen Abteilung des Klinikums Großhadern der LMU München. Gewebe von Niere, Ösophagus, Lunge, Milz, Eierstöcken, Brust, Tube, Samenstrang, Portalvene und Trachea entstammen anderen Kliniken oder der Rechtsmedizin. Sie wurden in Formaldehyd für mindestens 24h fixiert, dann 30 Minuten in Leitungswasser gewaschen. Mit Hilfe einer automatischen Einbettungsmaschine, welche unter Verwendung einer Alkoholserie (Beginn bei 50%) und Xylol arbeitet, erfolgte dann die Einbettung in Paraffin. Es wurden 6 µm dicke Schnitte angefertigt. Knochenmark wurde in Aceton fixiert.

### **3.2. Generierung der Antikörper**

Anti-hBD-1, -hBD-2 und -LL-37 wurden als primäre Antikörper verwendet. Die Antikörper wurden laut Standard-Immunisierungs-Protokoll in Kaninchen im Labor von Herrn Prof. Dr. Dr. R. Bals, Universitätsklinikum Marburg, hergestellt und nur für diese Studie zur Verfügung gestellt. Für die Herstellung von Anti-hBD-1 wurden gereinigte Peptide aus Urin verwendet, für Anti-hBD-2 aus einem rekombinanten Baculovirus-System isolierte Peptide und für LL-37 chemisch hergestellte Peptide.

Für die Herstellung von Antikörpern gegen hBD-2 wurden 100 µg des Peptids mit Hämocyanin gepaart und in zwei Kaninchen injiziert. Nach zwei und sieben Wochen wurde die Injektion mit der selben Dosis wiederholt. Der durch ELISA gemessene Titer gegen hBD-2 stieg von <50 auf über 10000 nach zehn Wochen für beide Tiere. Durch Reinigung an einer Protein A-Säule (HiTrap Protein A; Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) wurde eine IgG-Fraktion gewonnen. Ein ähnlich gewonnener Antikörper aus Kaninchen-Präserum wurde in allen Versuchen als Negativkontrolle verwendet. Der hBD-2-spezifische Antikörper zeigte keine Kreuzreaktion mit menschlichen Serumproteinen, anderen kationischen antimikrobiellen Peptiden, Lysozym, Lactoferrin, hBD-1 oder LL-37/hCAP-18 (Bals et al., 1998).

Die Antikörper gegen synthetisches LL-37 wurden durch ein Standard-Immunisierungs-Schema gewonnen. 100 µg mit Freund-Adjuvans vermisches Peptid wurden intramuskulär einem Kaninchen injiziert, die Injektion wurde noch zweimal wiederholt. Das gewonnene Antiserum wurde mit ELISA untersucht. Durch Reinigung an einer Protein G-Säule wurde eine IgG-Fraktion gewonnen (Pharmacia). Eine ähnlich gewonnene IgG-Fraktion aus Kaninchen-Präserum diente bei allen Versuchen als Negativkontrolle (Gudmundsson et al., 1996).

Alle Antikörper wurden auf ihre Spezifität für das entsprechende antimikrobielle Peptid hin untersucht. Es zeigte sich keine Kreuzreaktion mit anderen antimikrobiellen Peptiden oder anderen kationischen Substanzen wie Muzinen, Lactoferrin und Lysozym. Angesichts der hohen strukturellen Ähnlichkeit zwischen den antimikrobiellen Peptiden von Menschen und Rhesusaffen war eine Kreuzreaktivität der Antikörper wahrscheinlich.

### **3.3. Immunhistochemie**

Es wurde, wie schon erwähnt, eine indirekte immunhistochemische Methode in zwei Schritten gewählt. Vor Durchführung der immunhistochemischen Färbung wurden alle Schnitte zunächst in Xylol für 20 Minuten entparaffiniert, dann in einer absteigenden Alkoholreihe hydriert (jeder Schnitt eine Minute zweimal in 100%, 96%, 80%, 70% und 50% Alkohol).

Benutzt wurde bei allen drei Antikörpern die Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode. Als Pufferlösung wurde TBS verwendet. 6,1g Trishydroxymethylaminomethan wurden in 50 ml destilliertem Wasser gelöst, 37 ml 1N Salzsäure wurden hinzugefügt, dann wurde mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1l aufgefüllt. Der pH betrug 7,6. Ein Teil dieser Lösung wurde mit neun Teilen 0,85% NaCl verdünnt. Nach der Entparaffinierung und Hydrierung verblieben die Schnitte für fünf Minuten in TBS. Um die endogene Peroxidase zu eliminieren, wurden die Schnitte für fünf Minuten in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gestellt. Dann wurden sie in TBS für dreimal fünf Minuten gewaschen. Weiterhin wurden die Schnitte mit einer Lösung aus einem Teil Humanserum und fünf Teilen TBS inkubiert, um die unspezifische Hintergrundfärbung zu vermindern, welche hauptsächlich auf die Reaktion des Primärantikörpers mit Kollagen zurückzuführen ist. Überschüssiges Serum wurde entfernt und die Schnitte mit unterschiedlichen Verdünnungen des Primärantikörpers mit TBS für 18 Stunden bei 4° C inkubiert.

Die Verdünnungen für jeden Antikörper und jedes Organ waren 1:100 und 1:500. Für Lunge, Niere und Milz wurden auch die Verdünnungen 1:1000, 1:2000 und 1:5000 getestet, für Cathelicidin und  $\beta$ -Defensin 2 auch die Verdünnung 1:50 für die Lunge. Bei Negativkontrollen wurde der Primärantikörper weggelassen. Nachdem die Schnitte dann dreimal fünf Minuten in TBS gewaschen worden waren, folgte für 30 Minuten, bei einer Verdünnung von 1:1000 in TBS, die Inkubation mit dem biotinylierten Anti-Kaninchen Sekundär-Antikörper aus der Ziege (Avidin bindet 4 Moleküle Biotin). Nachdem die Schnitte dann wieder dreimal fünf Minuten in TBS gewaschen worden waren und für 20 Minuten mit peroxidasekonjugiertem Streptavidin in einer 1:150-Verdünnung mit TBS inkubiert waren, folgte eine zehnminütige Inkubation mit DAB (6 mg 3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid in 10 ml destilliertem Wasser und zwei Tropfen 3%  $H_2O_2$ ) als Chromogen. Wenn eine Kerngegenfärbung durchgeführt wurde, geschah das zu diesem Zeitpunkt. Um die Kerne gegenzufärben, wurden die Schnitte 15 Sekunden in Mayer's Hämalaun getaucht, dann zehn Minuten unter fließendem Wasser gespült.

Die Schnitte wurden dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und nach 5 Minuten in Xylol mit DPX bedeckt.

Für jedes Organ oder Gewebe wurde Material von drei bis vier Tieren benutzt.

### **3.4. Auswertung**

Die Färbungsintensität für das Signal und die Hintergrundfärbung wurden semiquantitativ beurteilt: keine Färbung (0), wenig Färbung (+), mittlere Färbungsintensität (++), starke Färbung (+++), sehr starke Färbung (++++).

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Orte der Expression antimikrobieller Peptide beim

#### Rhesusaffen

Die untersuchten antimikrobiellen Peptide wurden beim Rhesusaffen vor allem in epithelialen, aber auch anderen Zelltypen mit Hilfe oben beschriebener Nachweismethode gefunden. Bei Kontrollen, in denen der Primärantikörper weggelassen wurde, zeigte sich kein spezifisches Signal.

Im Respirationstrakt wurden die antimikrobiellen Peptide vorwiegend in den großen Atemwegen exprimiert, in Hinsicht auf die Expressionsintensität zeigte sich ein abnehmender proximal-distaler Gradient. Die Defensine und das Cathelicidin sind sowohl in Zilienzellen des Oberflächenepithels (Abb. 1) als auch in serösen Drüsenzellen (Abb. 2, 3) lokalisiert. Die mukösen Zellen (einschließlich der Becherzellen) sind negativ. In allen positiven Zellen ergab sich für alle Antikörper und alle getesteten Verdünnungen ein mittelstarkes bis intensives Signal (++ bis +++), siehe Abbildungen 1 bis 3. Stets waren einige Epithelzellen stärker gefärbt als andere. Alveolarmakrophagen erschienen stets stark positiv (Abb. 4, 5). Sie färbten sich mit den Antikörpern gegen Defensine und gegen das Cathelicidin.

In Bronchien (Abb. 1) und Trachea war das Signal für hBD-1 (Abb. 2) und LL-37 (Abb. 1,3) meist mittelstark (++). Im Epithel reagieren die ausdifferenzierten Flimmerepithelzellen positiv, aber auch die basalen Zellen (Abb. 3), speziell bei LL-37. Becherzellen und muköse Drüsen exprimierten die untersuchten Peptide nicht. Mitunter färbten sich auch die Flimmerhärchen an. Dieses positive Signal beruht vermutlich auf artifiziell adsorbierten sezernierten Defensinen bzw. Cathelicidinen.



Abb. 1 Rhesusaffe, Bronchusepithel, LL-37, 500fach

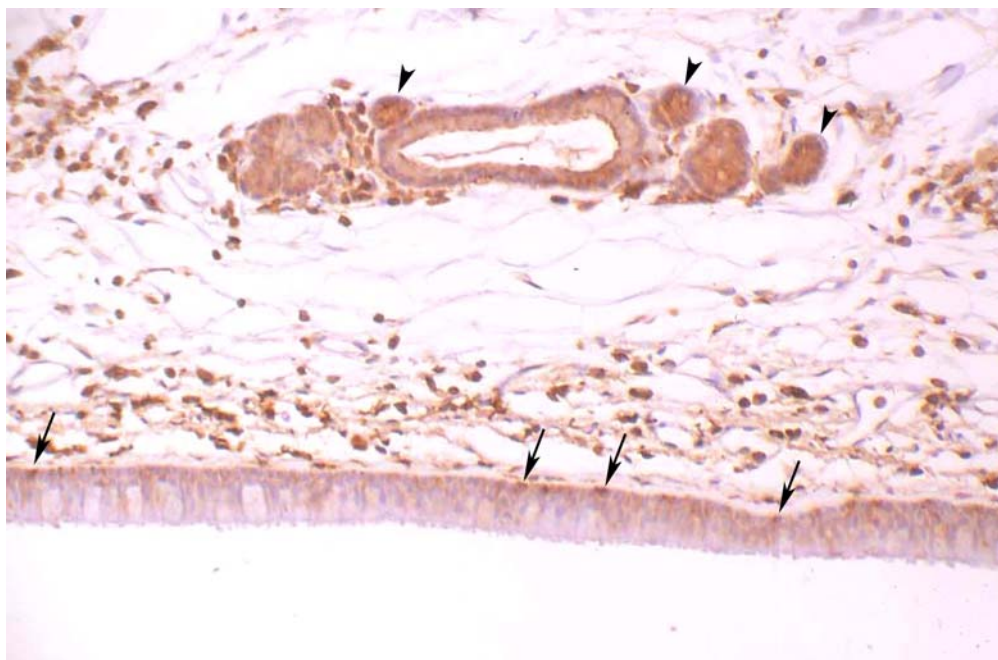


Abb. 2 Rhesusaffe, Trachea, positiver Nachweis von hBD-1 im Epithel der Oberfläche (Pfeile), der serösen Drüsenzellen (Pfeilköpfe) und in Lymphozyten im subepithelialen Bindegewebe, 250fach

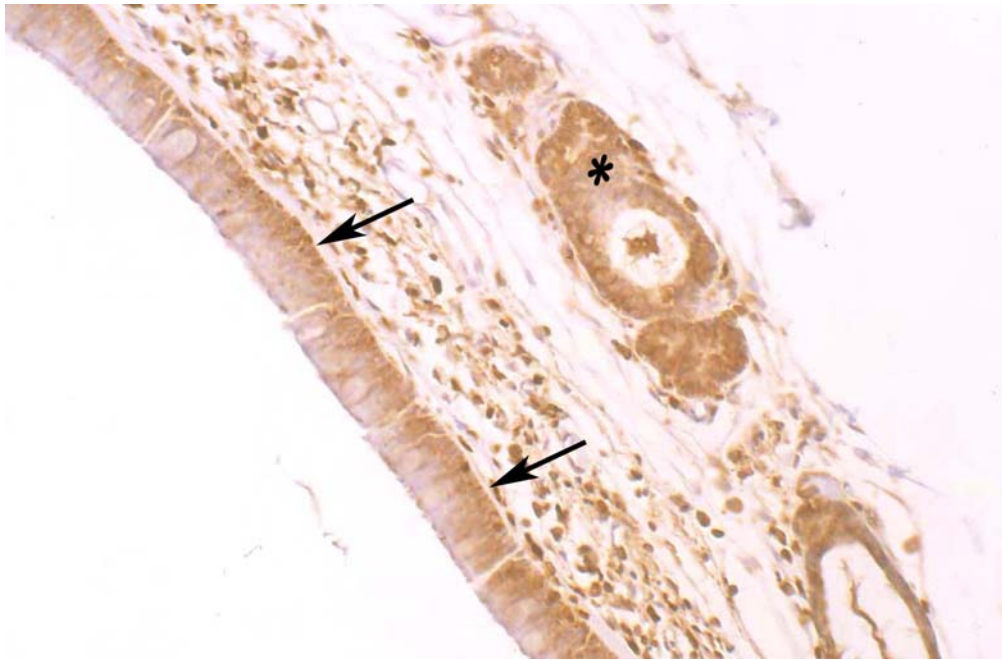


Abb. 3 Rhesusaffe, Trachea, LL-37, deutlich positive Reaktion auch in den basalen Zellen des Oberflächenepithels (Pfeile), Sternchen seröse Drüsen, 250 fach

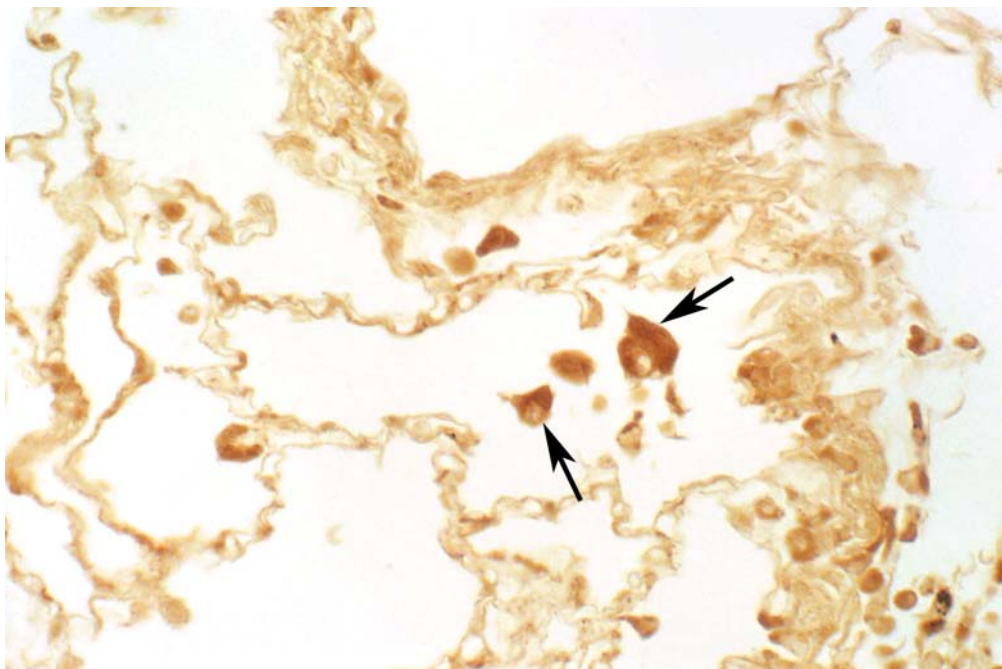


Abb. 4 Rhesusaffe, Lunge, hBD-2, kräftige Reaktion in den Alveolarmakrophagen (Pfeile), zarte Reaktion im Alveolarepithel, 500fach

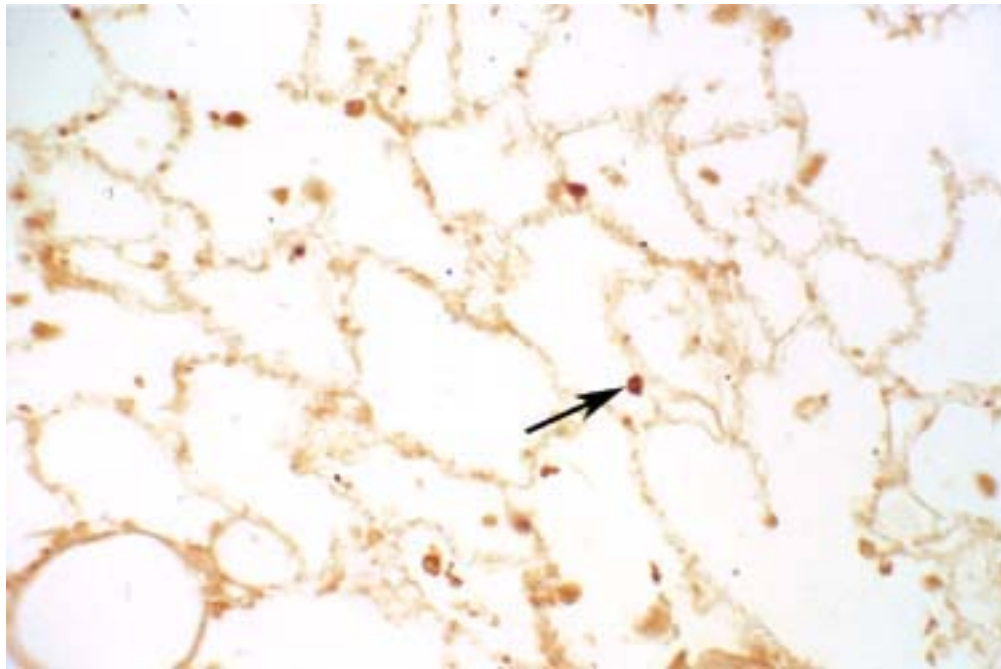


Abb. 5 Rhesusaffe, Lunge, LL-37, Alveolarepithel (Pfeil), 250fach

Im Alveolarbereich ergab sich für die Epithelien ein schwaches oder nur fraglich positives Signal. Für hBD-2 zeigten die Pneumozyten II ein positives Signal, aber vermutlich reagieren auch die Pneumozyten I schwach positiv (Abb. 4).

Im Gastrointestinaltrakt wurden Ösophagus, Magen, Dünn- und Dickdarm, das Pankreas und die Glandula parotis untersucht. In der Magenmukosa färbten alle drei Antikörper die Hauptzellen in den basalen Anteilen der Magenmukosa mittelstark an. Die Belegzellen des Corpus/Fundus reagierten mit dem Antikörper gegen hBD-2 ebenfalls positiv (Abb. 6).

Im Dünn- und Dickdarm färbten sich die Saumzellen des Oberflächenepithels diffus für die drei untersuchten Peptide an (Abb. 7 - 8). Die Reaktion in den Becherzellen fällt variabel aus, oft sind sie schwach positiv gefärbt (Abb. 7, 8). hBD-2 reagiert sehr kräftig in den Panethzellen (Abb. 8). Eigentümlicherweise zeigen viele endokrine Darmzellen eine positive Reaktion mit LL-37 (Abb. 7). Auch die sekretorischen Azini des Pankreas färbten sich für alle drei Peptide in etwas variabler aber meist schwacher Intensität an.



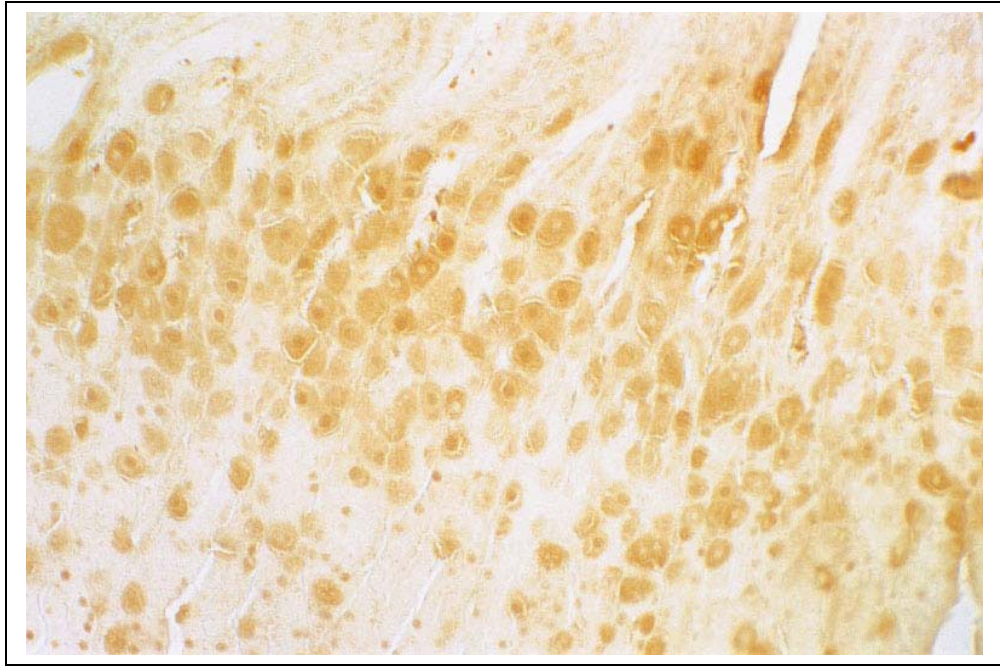


Abb. 6 Rhesusaffe, Magen, hBD-2, 250 fach

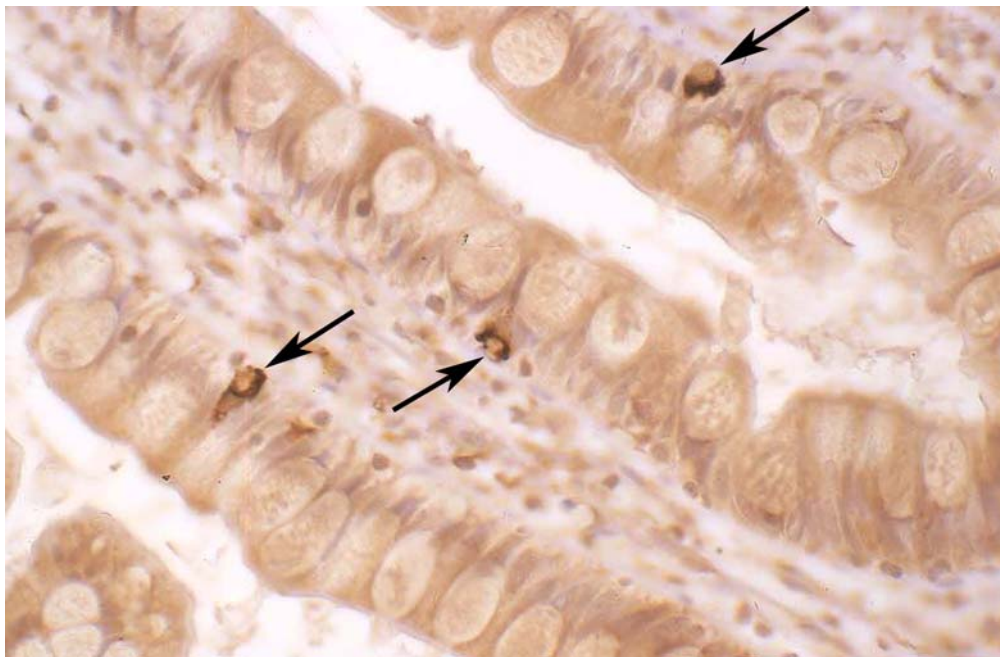


Abb. 7 Rhesusaffe, Dünndarm, LL-37, kräftig positiv reagierende endokrine Zellen (Pfeile), schwächere Reaktion in den Enterozyten, 500 fach

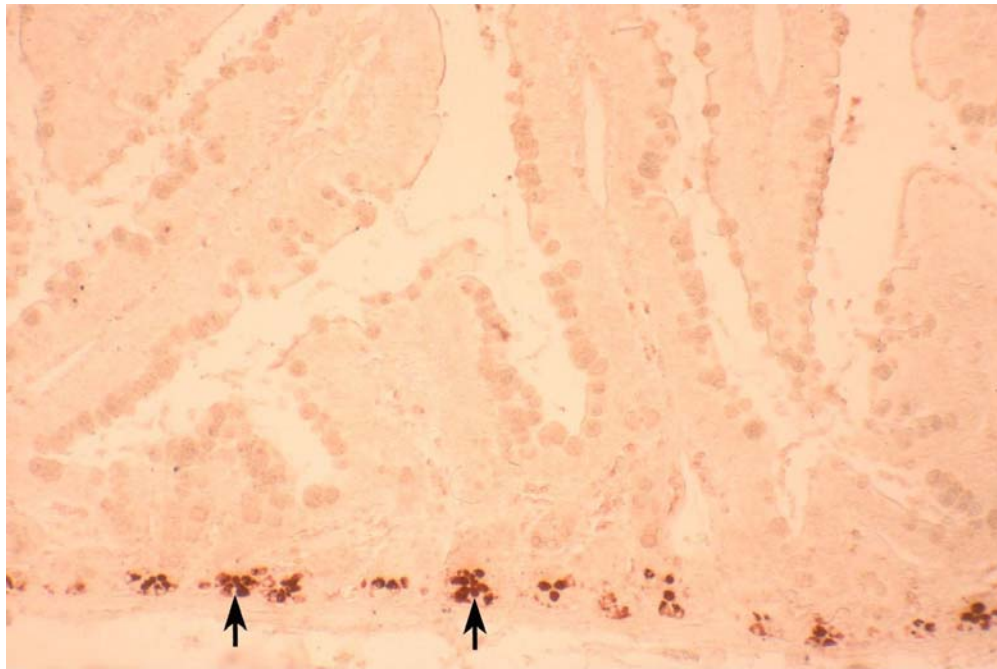


Abb. 8 Rhesusaffe, Dünndarm, Panethsche Körnerzellen (Pfeile), hBD-2, 125 fach

Die interlobulären Gänge der Glandula parotis zeigten vereinzelt positive Zellen für LL-37, während die sekretorischen Azinuszellen für beide Defensine schwach positiv waren.

In der Niere exprimierten (meist schwach) die proximalen sowie (meist kräftiger) die distalen Tubuli und die Sammelrohre alle drei antimikrobiellen Peptide.

Für hBD-1 und hBD-2 war die Färbung in den Sammelrohren und den distalen Tubuli mittelstark, siehe Abbildungen 9 - 13. Auch für LL-37 war die Signalgebung hier gut erkennbar. Für hBD-2 ergab sich öfter eine recht intensive Anfärbung (++) im Lumen der Sammelrohre, siehe Abbildungen 12 und 13, bis zu einer Verdünnung von 1:1000. Selbst bei einer Verdünnung von 1:2000 zeigten noch einige Tubuli und Sammelrohre eine gleichmäßige Anfärbung, gleichmäßig auch innerhalb einer Zelle. Auch für LL-37 kam es in den Sammelrohren der Niere zu intraluminaler Färbung. In den proximalen Tubuli wurden die drei untersuchten antimikrobiellen Peptide nur schwach exprimiert, jedoch reagierte LL-37 hier oft auch mittelstark (Abb. 11).

In den Nierenkörperchen reagierten die Podozyten mit dem Antikörper gegen hBD-2 und LL-37 (Abb. 10,11) positiv.



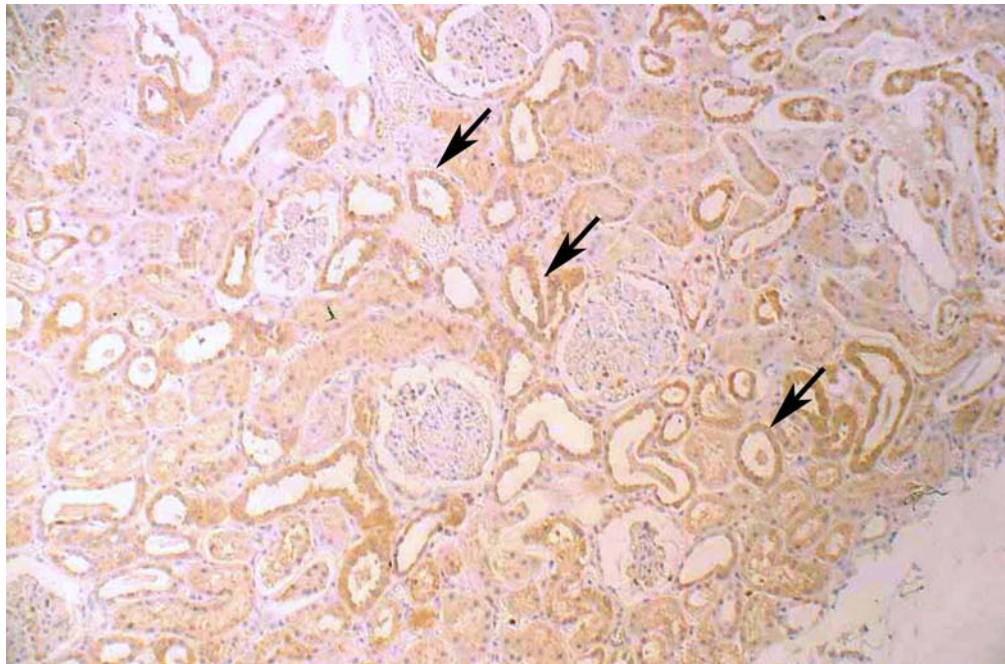


Abb. 9 Rhesusaffe, Niere hBD-1, die Reaktion fällt in den distalen Tubuli (Pfeile) am kräftigsten aus, 125fach

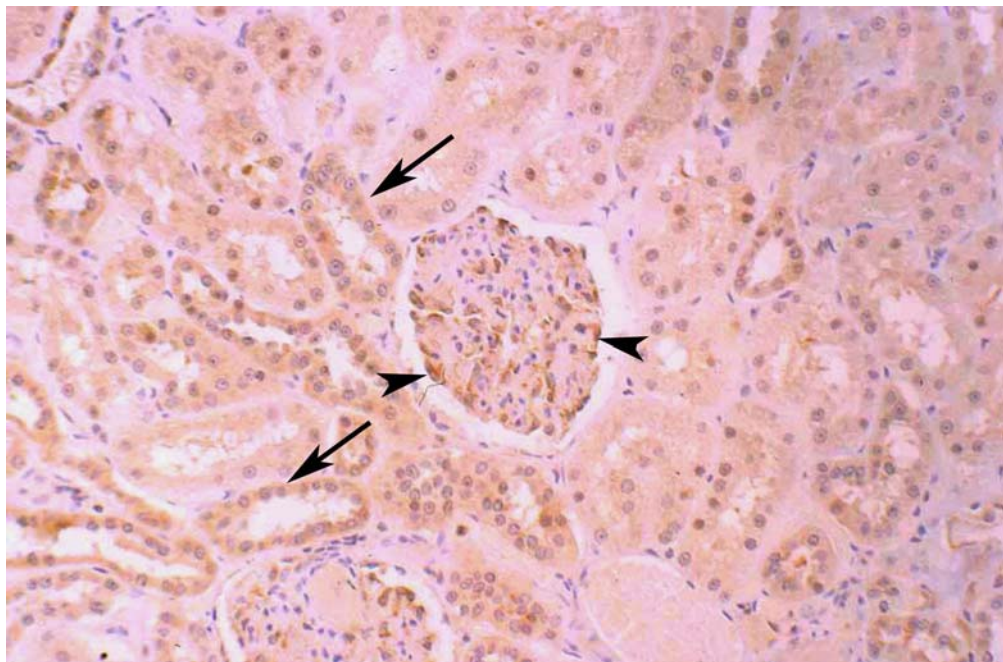


Abb. 10 Rhesusaffe, Niere hBD-2, deutliche Reaktion in den distalen Tubuli (Pfeile) und auch in den Podozyten der Nierenkörperchen (Pfeilköpfe), 250fach

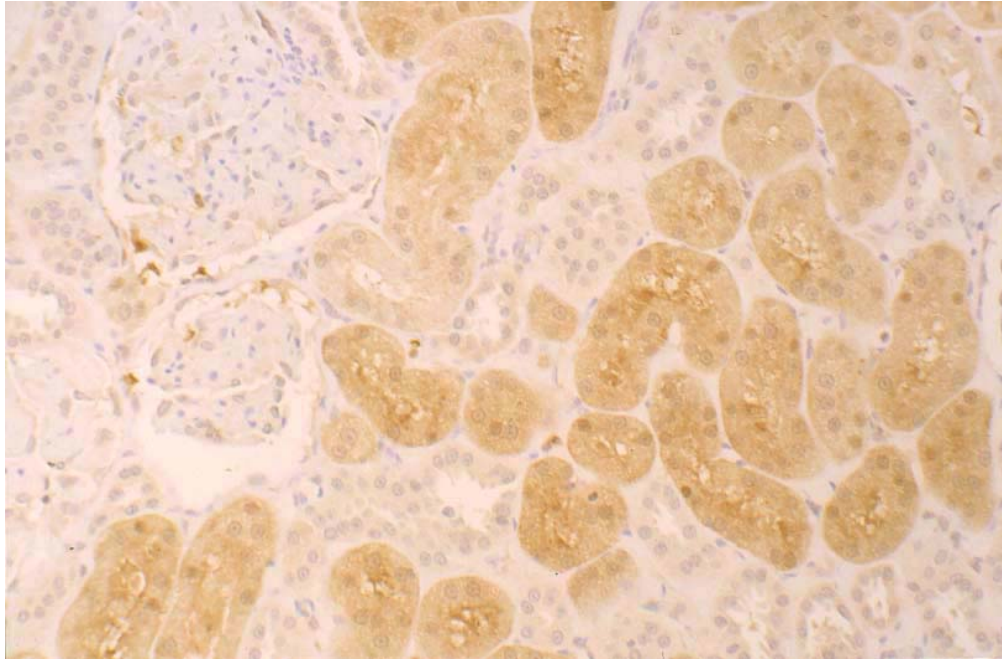


Abb. 11 Rhesusaffe, Niere, LL-37, deutlich positive Reaktion in den proximalen Tubuli, sowie in vielen Podozyten, 250fach

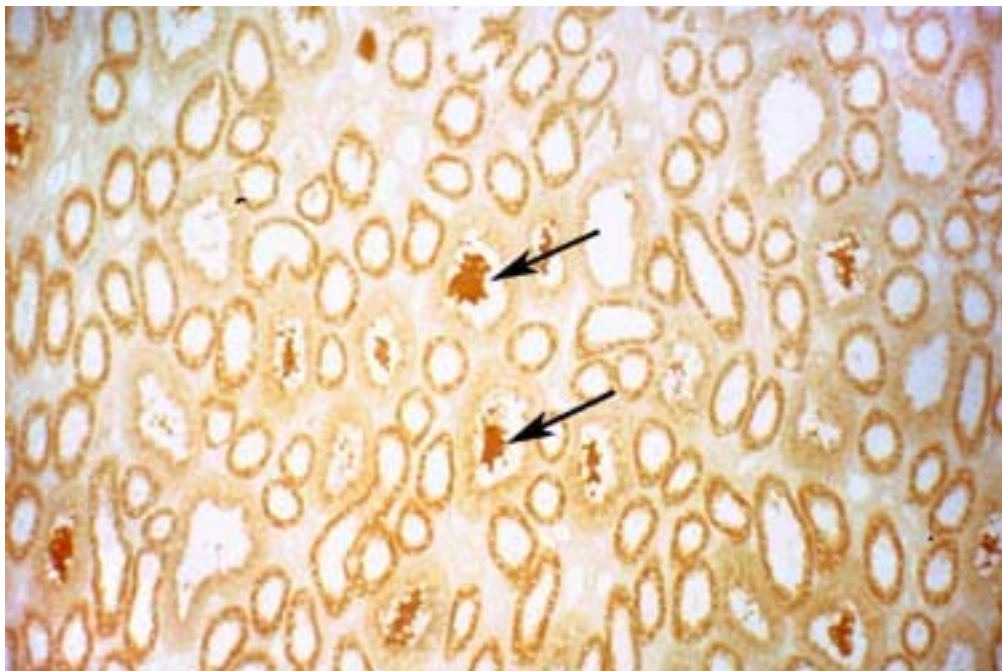


Abb. 12 Rhesusaffe, Niere, Markregion, hBD-2, Pfeile weisen auf positiv reagierendes Material in Sammelrohren, 125fach



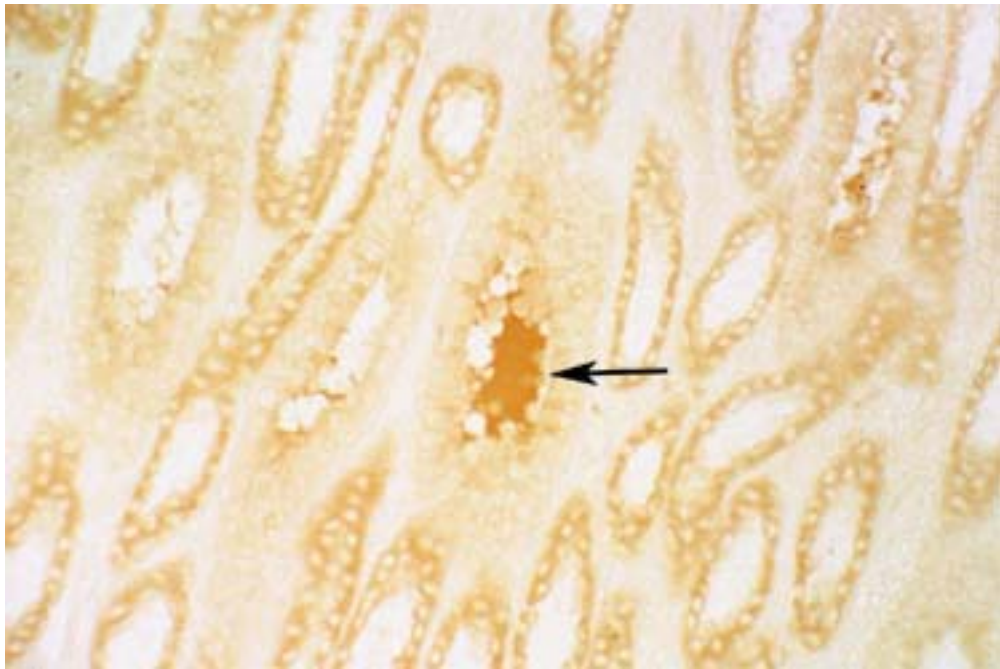


Abb. 13 Rhesusaffe, Niere, hBD-2, Sammelrohre, z.T. mit positiv reagierendem Material im Lumen (Pfeil), 250fach

Das Epithel der ableitenden Harnwege reagiert generell mittelstark (Abb. 14 – 27), wobei sowohl die apikalen Deckzellen, als auch basal im Epithel gelegene Zellen die am stärksten reagierenden Zellen sein können.

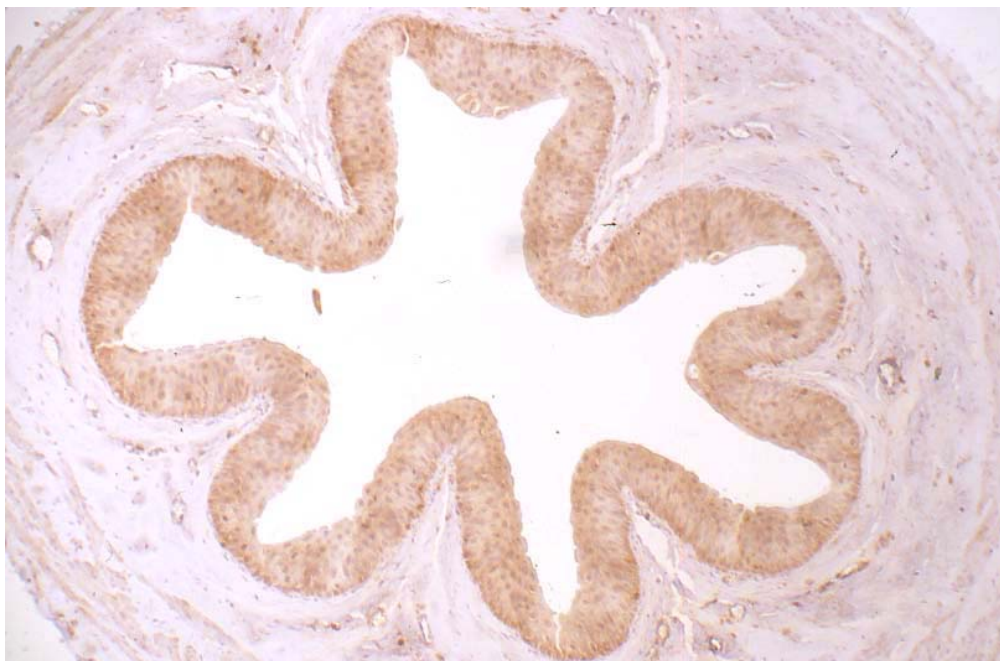


Abb. 14 Rhesusaffe, Ureter, hBD-1, Kerngegenfärbung mit Hämalaun, 125fach



Abb. 15 Rhesusaffe, Ureter, hBD-2, 50fach

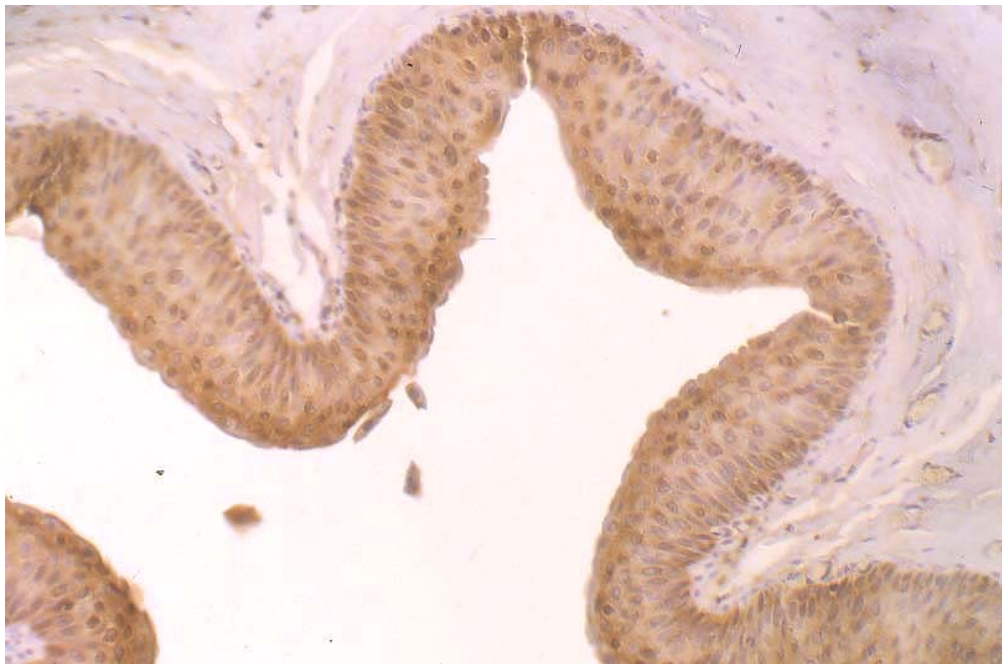


Abb. 16 Rhesusaffe, Ureter, hBD-2, hier reagieren die apikalen Zellen am kräftigsten, Gegenfärbung mit Hämalaun, 250fach



Abb. 17 Rhesusaffe, Ureter, LL-37, 50fach



Abb. 18 Rhesusaffe, Ureter, LL-37, 125fach





Abb. 19 Rhesusaffe, Ureter, LL-37, Gegenfärbung mit Hämalaun, der Antikörper färbt oft auch das perinukleäre Zytoplasma, 250fach

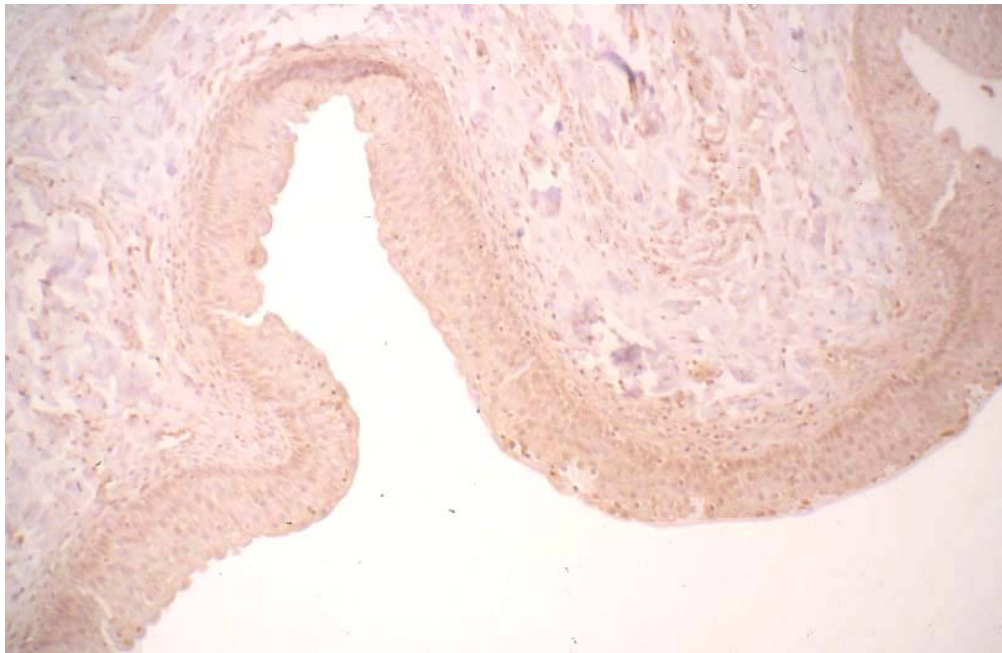


Abb. 20 Rhesusaffe, Harnblase, hBD-1, generell schwache Reaktion, 125fach



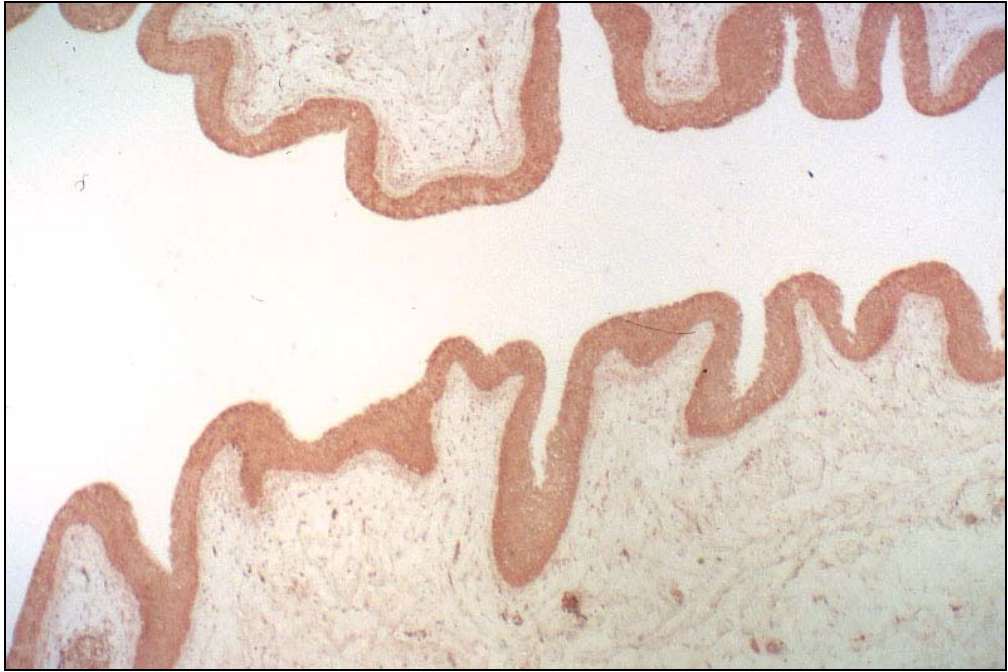


Abb. 21 Rhesusaffe, Harnblase, hBD-2, 50fach

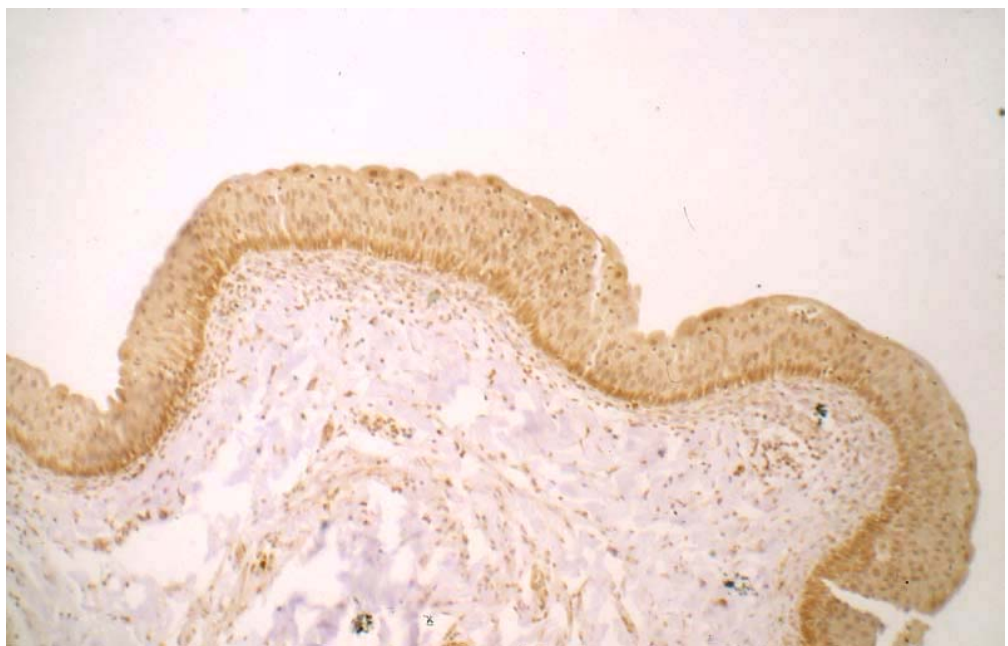


Abb. 22 Rhesusaffe, Harnblase, LL-37, 125fach

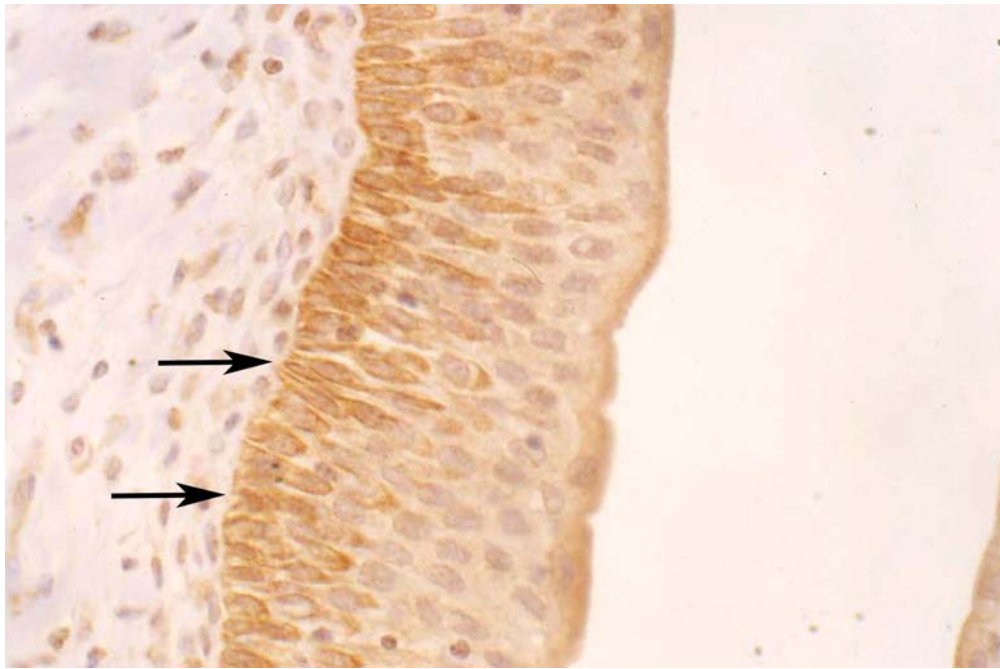


Abb. 23 Rhesusaffe, Harnblase, LL-37, beachte die recht kräftige Reaktion im Zytoplasma der basalen Epithelzellen (Pfeile) und die leicht betonte Reaktion in den Deckzellen (Grenze zum Lumen), 500fach

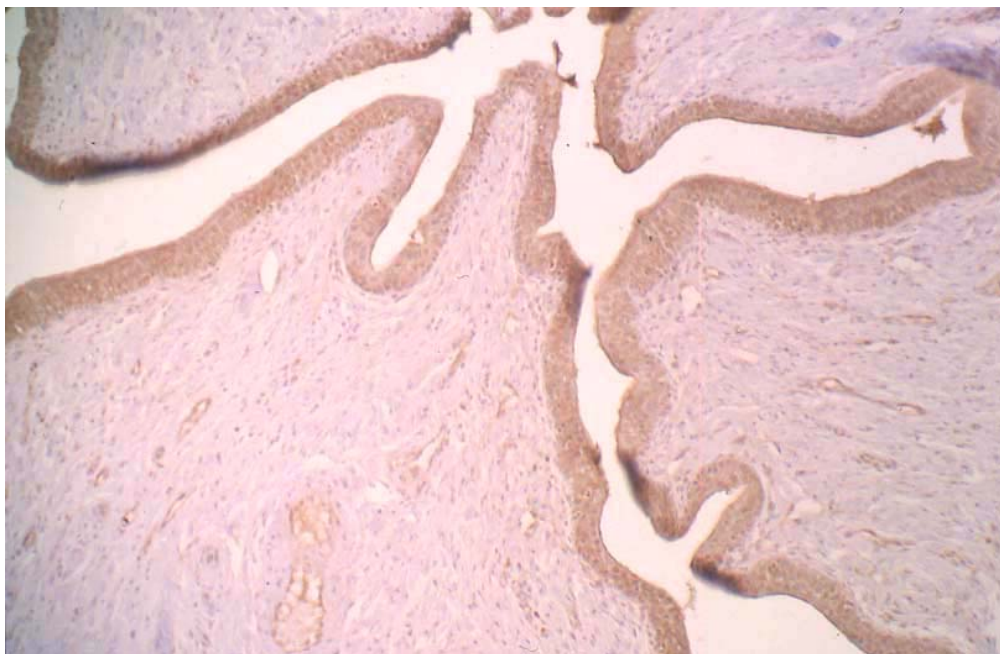


Abb. 24 Rhesusaffe, Urethra, positive Reaktion im Epithel, hBD-2, 125fach

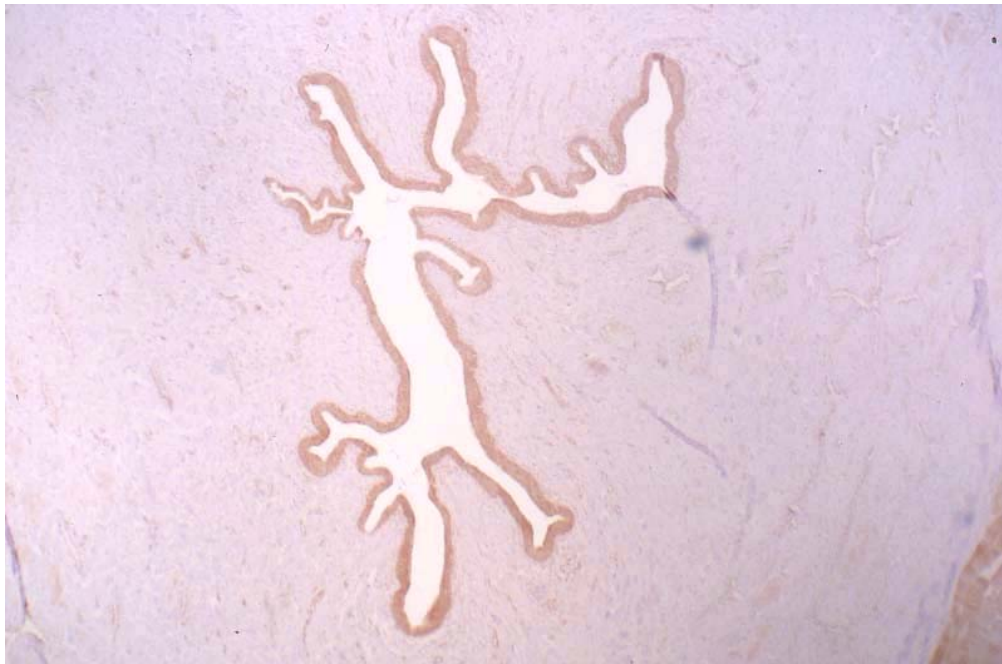


Abb. 25 Rhesusaffe, Urethra, LL-37, 50fach

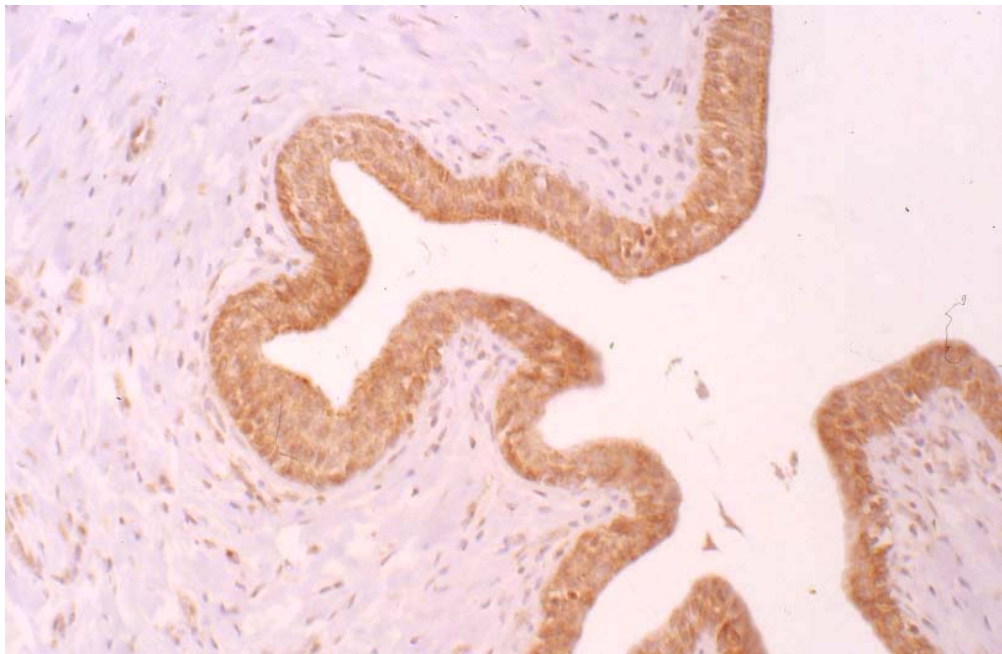


Abb. 26 Rhesusaffe, Urethra LL-37, 250fach



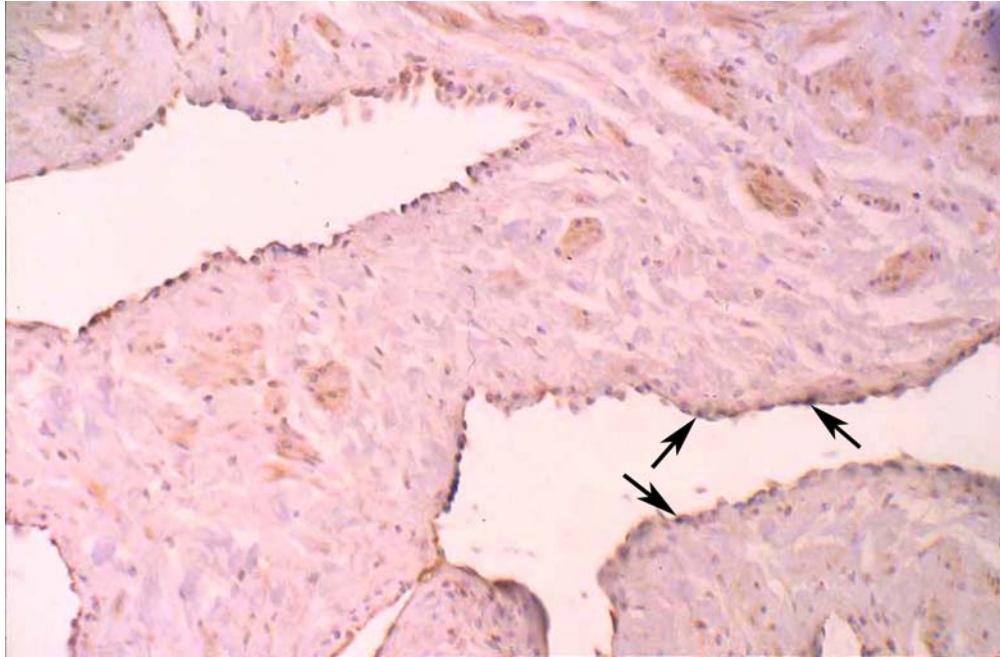


Abb. 27 Rhesusaffe, Urethra, Venenplexus, hBD-2, wie in einigen anderen Organen reagiert das Endothel von Venen positiv (Pfeile), 250fach

Im männlichen Reproduktionssystem waren Defensine in Einzelzellen der Samenkanälchen exprimiert, höchstwahrscheinlich in Sertolizellen.

Im weiblichen Reproduktionstrakt färbte sich das Epithel der nichtlaktierenden Brustdrüse für alle drei untersuchten Peptide. Das Tubenepithel (Abb. 28 – 31) und die Uterusdrüsen (Abb. 32) waren für hBD-1, hBD-2 und LL-37 positiv.



Abb. 28 Rhesusaffe, Tuba uterina, hBD-1, 50fach

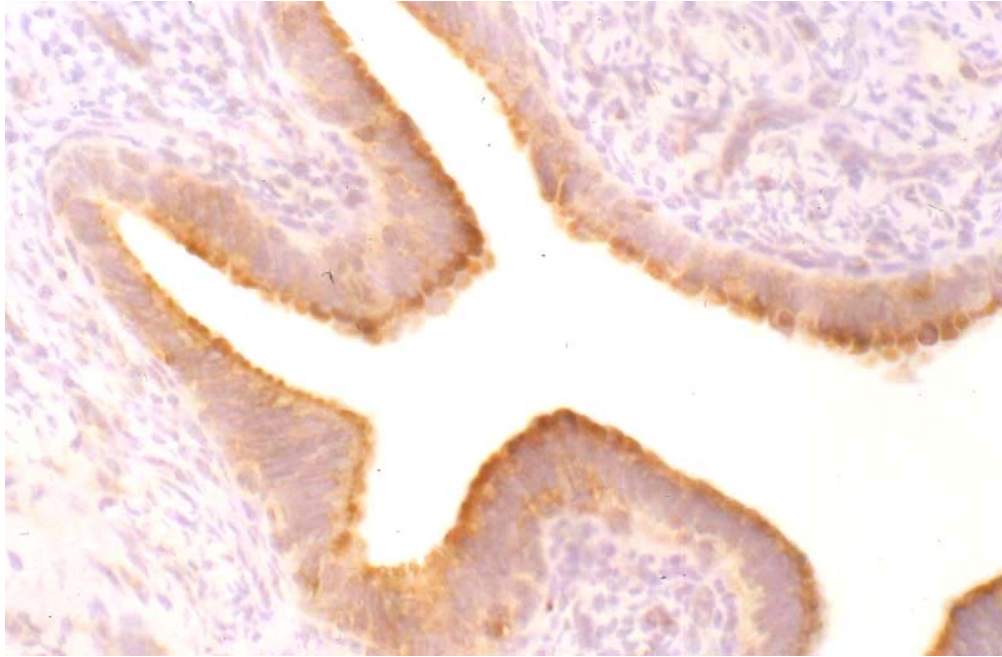


Abb. 29 Rhesusaffe, Tuba uterina, hBD-1, deutlich positive Reaktion im apikalen Zytoplasma des Oberflächenepithels, 250fach

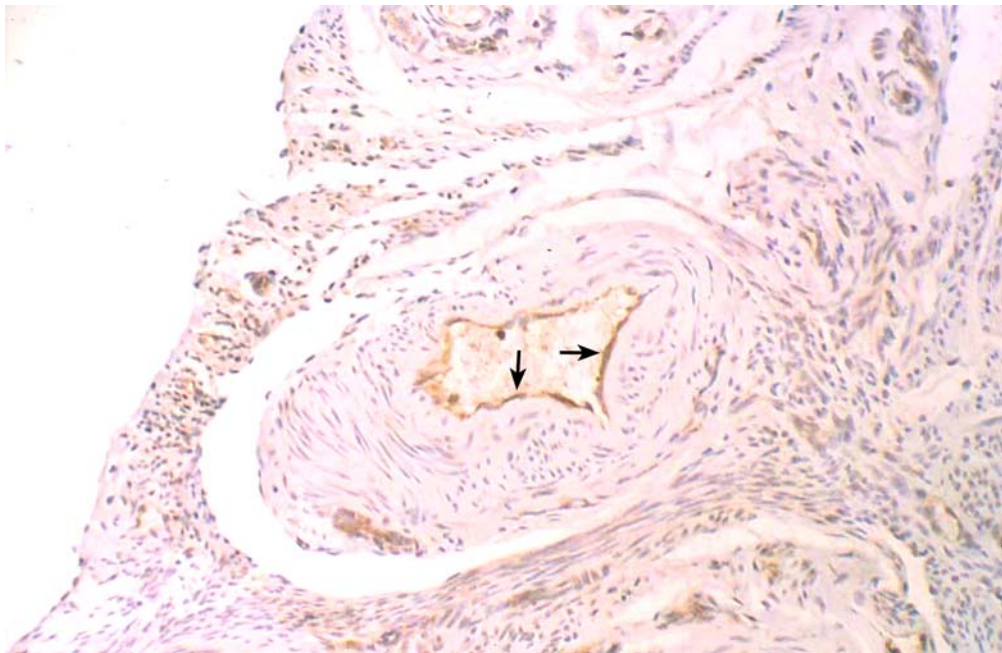


Abb. 30 Rhesusaffe, Tuba uterina, hBD-2, positive Reaktion im Endothel einer Arterie (Pfeile), 250fach





Abb. 31 Rhesusaffe, Tuba uterina, hBD-2, 250fach



Abb. 32 Rhesusaffe, Uterus, LL-37, 125fach

Die Becherzellen der Konjunktiva waren für die beiden Defensine positiv.

Die Endothelzellen der Blutgefäße waren in unterschiedlichen Organen für LL-37 positiv (Abb. 27, 30). Defensin-positive subepitheliale Makrophagen im Darmtrakt wurden durch parallele Färbung mit einem CD74-Antikörper identifiziert.

Für Herz und Milz ergab sich keinerlei positives Signal.

In der Epidermis reagieren alle drei Peptide positiv, hBD-2 und LL-37 werden besonders stark exprimiert.

Nachfolgend nochmals eine tabellarische Zusammenfassung der hier für den Rhesusaffen beschriebenen Ergebnisse (Tabelle 1).

## Tabelle 1 : Ergebnisse

Tabellenübersicht Rhesus-Affe: Färbungsintensität der verschiedenen Antikörper für die  
untersuchten Gewebe

0 : keine Färbung - + : leichte Färbung - ++ : mittelstarke Färbung - +++ : starke Färbung

Organsystem	Gewebeart, Zelltyp	Färbungsintensität		
		hBD-1	hBD-2	LL-37
Atemwege	Epithel	++	++	++
	seröse Drüsenzellen	++	++	++
	Alveolarmakrophagen	+++	+++	+
GI-Trakt	Ösophagus	0	0	0
	Magen, Hauptzellen	+	+	+
	Magen, Belegzellen	++	++	+++
	Dünndarm, Enterozyten	++	++	++
	Dünndarm, Panethzellen	+++	+++	+
	Dickdarm, Epithel der Oberfläche und der Krypten	+	+	+
	Pankreas	+	+	+
	Parotis, interlobuläre Gänge	0	0	++
	Parotis, seröse Drüsen	+	+	0
Urogenitaltrakt	Niere, distale Tubuli	++	++	+++
	Niere, proximale Tubuli	+/+++	+	+
	Niere, Sammelrohre	++	++	++
	Ureter, Epithelzellen	+	++	++
	Harnblase, Epithelzellen	++	++	++
	Urethra	+	+	++
Reproduktionsorgane	Nichtlaktierende Mamma, lobuläre Epithelstrukturen	++	++	++
	Uterusdrüsen	+	++	++
	Testis, Sertolizellen	++	++	0
	Samenblase, Epithelzellen	+	++	++
Andere	Konjunktiva, Becherzellen	++	++	0
	Makrophagen CD74-positiv	+++	+++	0
	Herz, Milz	0	0	0
	Epidermis	+	++	++



## 4.2. Orte der Expression antimikrobieller Peptide beim Menschen

### A) Atemtrakt

#### 1. Nasenmuschel

Im Epithel (Flimmerzellen) der vier untersuchten Nasenmuscheln war für hBD-1 die Signalintensität mittel- bis sehr stark (Abb. 1), für hBD-2 schwach bis stark, und für LL-37 stark. Auch in den serösen Endstücken der Schleimhautdrüsen war die Reaktion bei allen drei Peptiden positiv (Abb. 2). Auffallend war, dass LL-37 auch im Endothel des mukosalen Venenplexus exprimiert wurde (Abb. 3).

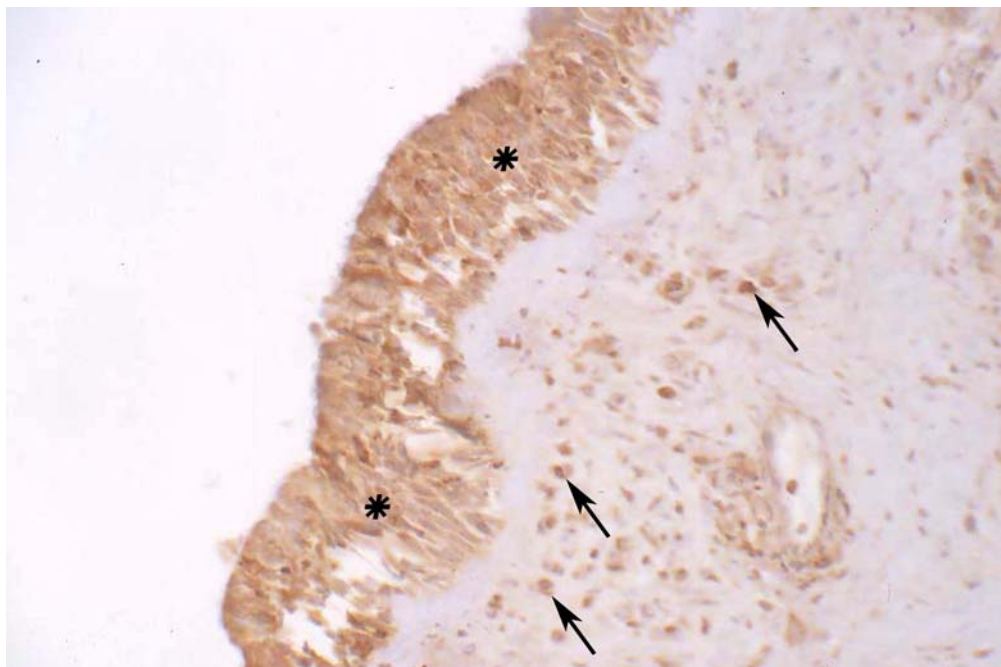


Abb. 1 Mensch, Nasenschleimhaut, Epithel, hBD-1, positive Reaktion im Oberflächenepithel (Sternchen) und in einzelnen subepithelialen freien Zellen (Pfeile), wahrscheinlich Makrophagen und T-Lymphozyten, 250fach

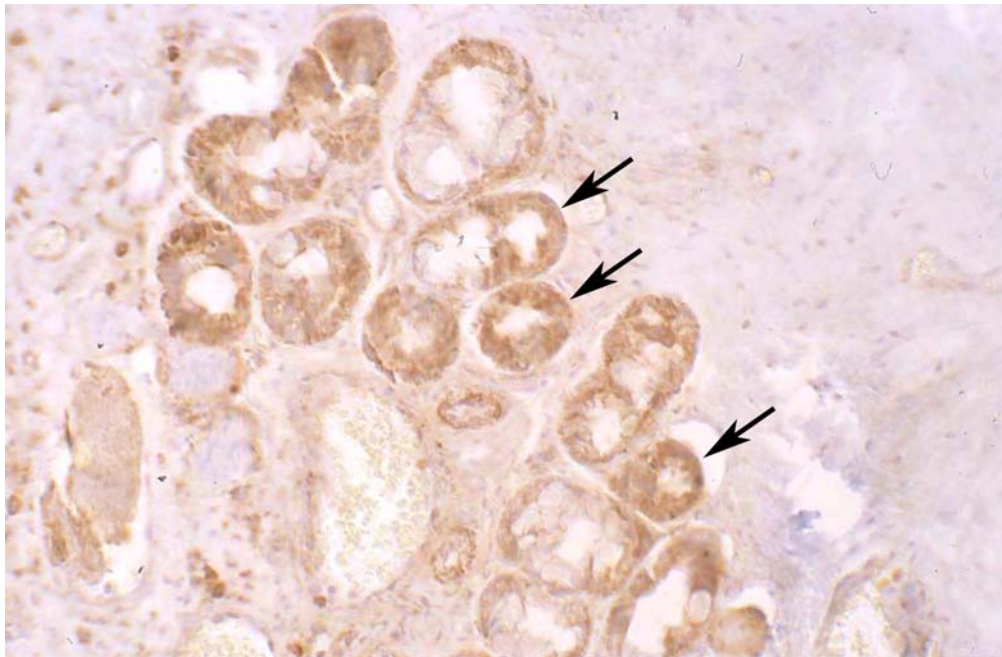


Abb. 2 Mensch, Nasenschleimhaut, hBD-1, positiv reagieren die serösen Drüsenendstücke (Pfeile), 250fach

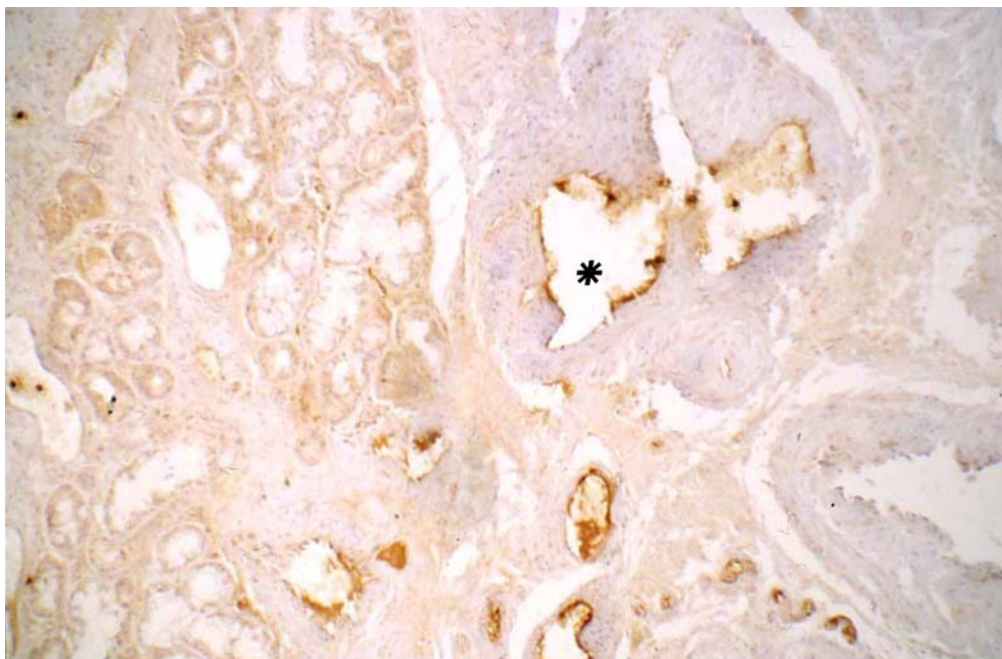


Abb. 3 Mensch, Nasenschleimhaut, LL-37, beachte die Expression dieses Peptids im Endothel der Venenplexus (Sternchen), 125fach

## **2. Trachea**

Im Epithel (Flimmerzellen) der Trachea ergab sich für hBD-1, hBD-2 und LL-37 ein mittelstarkes positives Signal (Abb. 4, 5). Interessant ist, dass beim LL-37 die stärkste

Expression im basalen Bereich des Epithels zu sehen ist (Abb. 5). Die Becherzellen reagieren bei allen drei Peptiden negativ (Abb. 5).

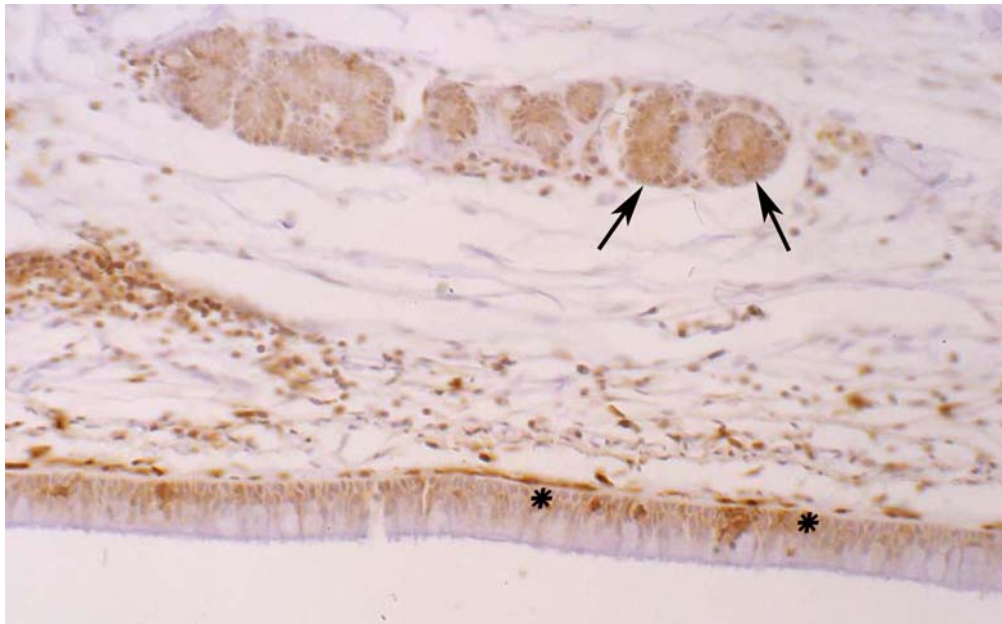


Abb. 4 Mensch, Trachea, LL-37, positive Reaktion basal im Epithel (Sternchen), in subepithelialen freien Zellen (Makrophagen und T-Lymphozyten) und in den serösen Endstücken der Trachealdrüsen (Pfeile), 250fach

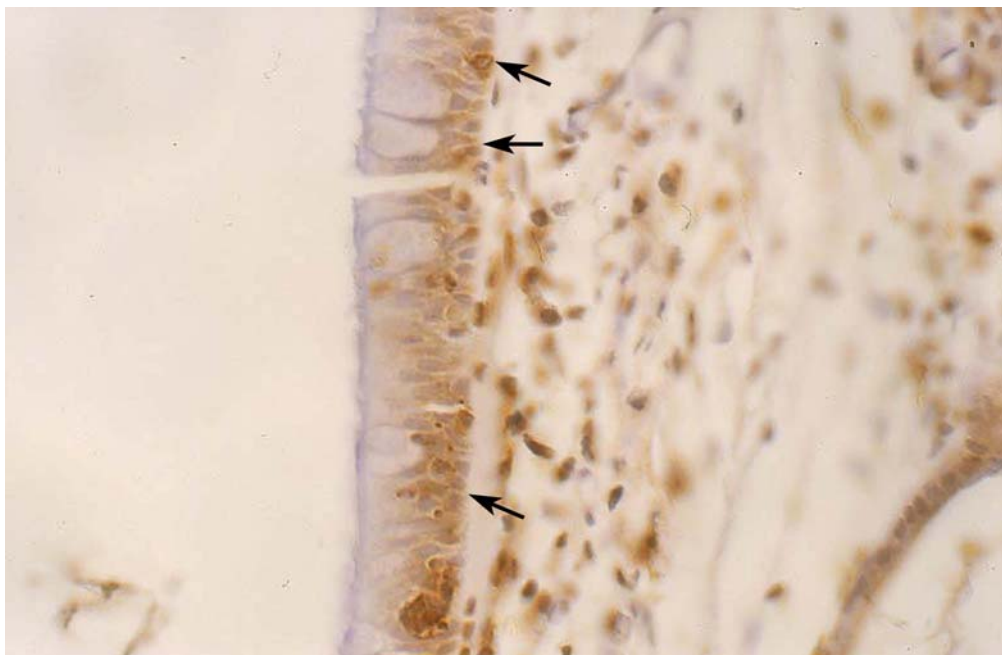


Abb. 5 Mensch, Trachea, LL-37, beachte die mittelstarke positive Reaktion in den basalen Epithelzellen (Pfeile) und in freien Bindegewebszellen, 500fach



### **3. Bronchien**

In den Bronchien der menschlichen Lunge färbte sich mit Antikörpern gegen alle drei untersuchten Peptide das Epithel generell mittelstark bis stark an, hBD-1 und hBD-2 reagieren im Epithel ähnlich wie in Nasenhöhle und Trachea (Abb. 6), wobei meistens einige Epithelzellen stärker als andere reagierten (siehe Abbildung 6, 7 und Tabelle 2). Die Expression der drei untersuchten Peptide war in den gesunden Bronchien etwas schwächer als in den kranken Bronchien. Meistens reagierten alle Epithelzellen deutlich positiv und nicht nur die Zellen der Epithelbasis wie bei der Trachea. Die Reaktion in den Becherzellen war negativ oder schwach.

In der CF-Lunge war in den Bronchien die Färbungsintensität für hBD-1 intensiv (je proximaler, desto stärker), auch für hBD-2 ergab sich eine intensive Anfärbung (siehe Abbildung 6). Auch für LL-37 war das Signal stark.

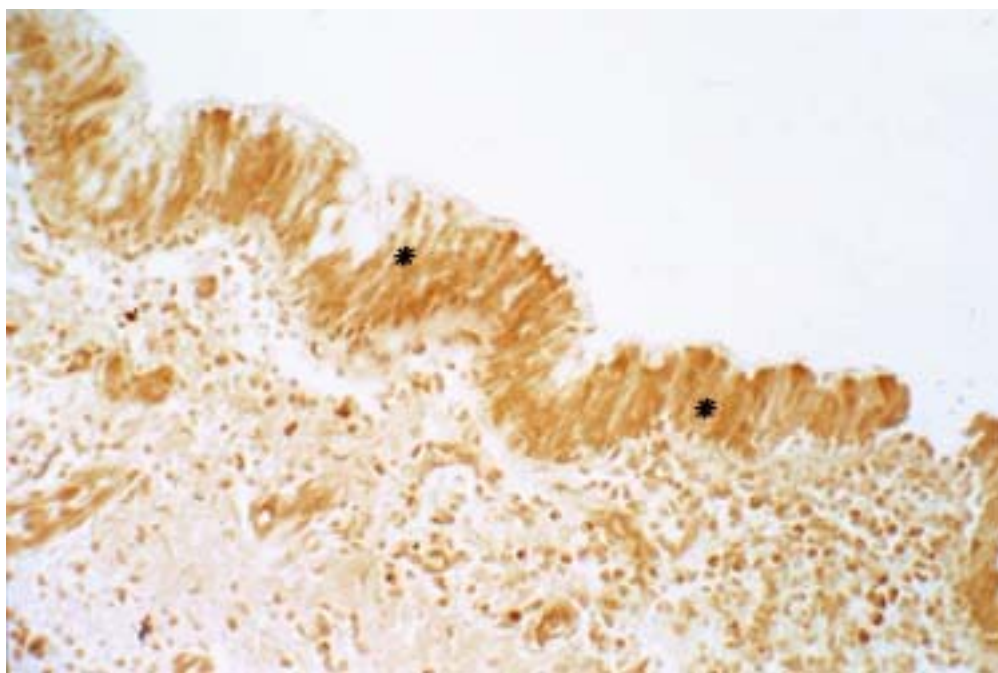


Abb. 6 Mensch, Bronchus, Mukoviszidose, hBD-2, außer den Epithelzellen (Sternchen) reagieren viele subepitheliale Zellen (Makrophagen und T-Lymphozyten) positiv, 250fach

In den Bronchien der drei untersuchten Pneumonielungen reichte das Signal für hBD-1 von mittelstark bis sehr stark, das gleiche gilt für die drei Emphysemlungen (siehe Abbildung 7). In den drei untersuchten nicht erkrankten Lungen war das Signal mittelstark bis stark, für den Antikörper hBD-2 war nur eine der nicht erkrankten Lungen stark positiv, ein

Befund, der an größerer Fallzahl überprüft werden muss. Für hBD-2 war bei Pneumonien das Signal mittelstark, für die Emphysemlungen mittelstark bis stark.

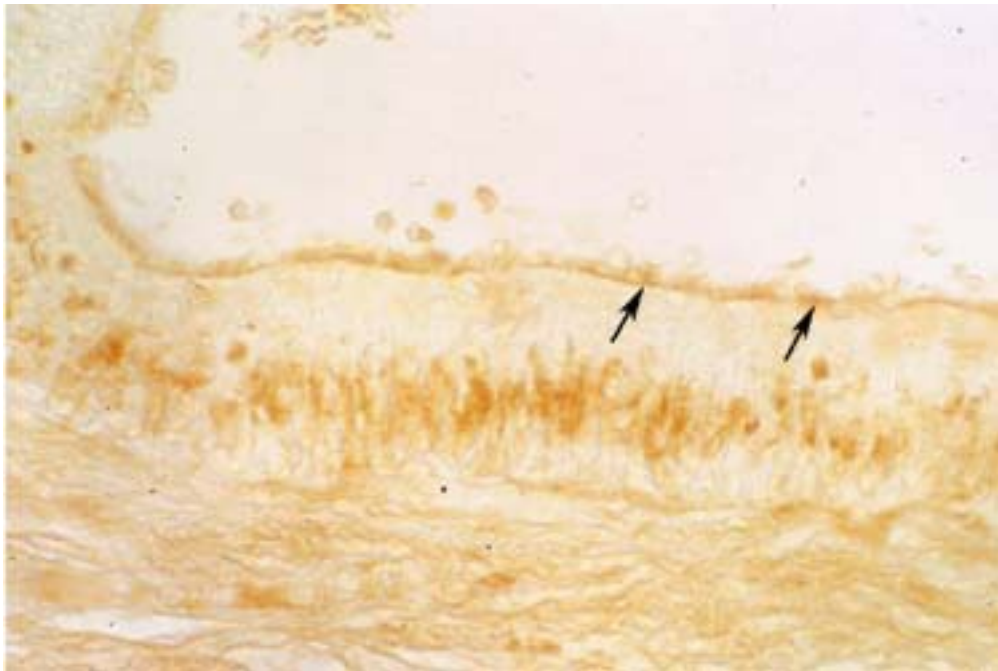


Abb. 7 Mensch, Emphysemlunge, hBD-2, die Reaktion ist im abgebildeten Präparat vor allem in mittlerer Epithelhöhe positiv; die positive Reaktion im Bereich der apikalen Zilien und Basalkörper (Pfeile) ist verdachtsweise ein Artefakt, 500fach

#### **4. Bronchiolen**

In den distalen Atemwegen, den Bronchiolen, ergab sich für alle 3 Peptide ein schwaches (hBD-1) bis mittelstarkes (hBD-2 und LL-37) Signal im gesamten Epithel der gesunden (Abb. 8, 9) und kranken Lungen, vor allem in den Clarazellen (siehe Abbildung 10).

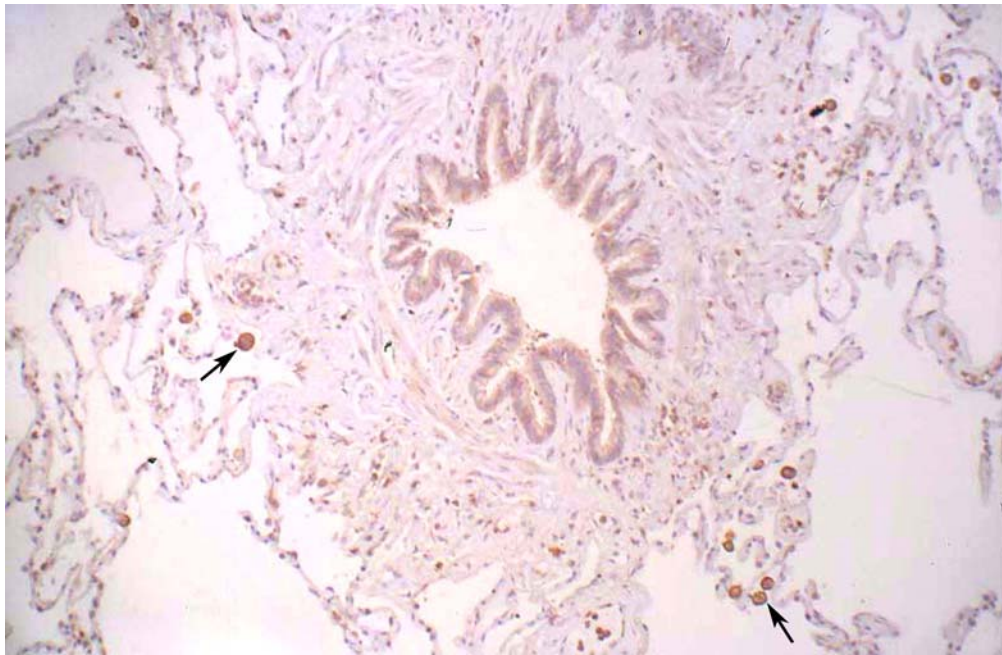


Abb. 8 Mensch, Bronchiolus, hBD-1, schwach positive Reaktion im Epithel; kräftige Reaktion in Makrophagen (Pfeile) und T-Lymphozyten., 125fach

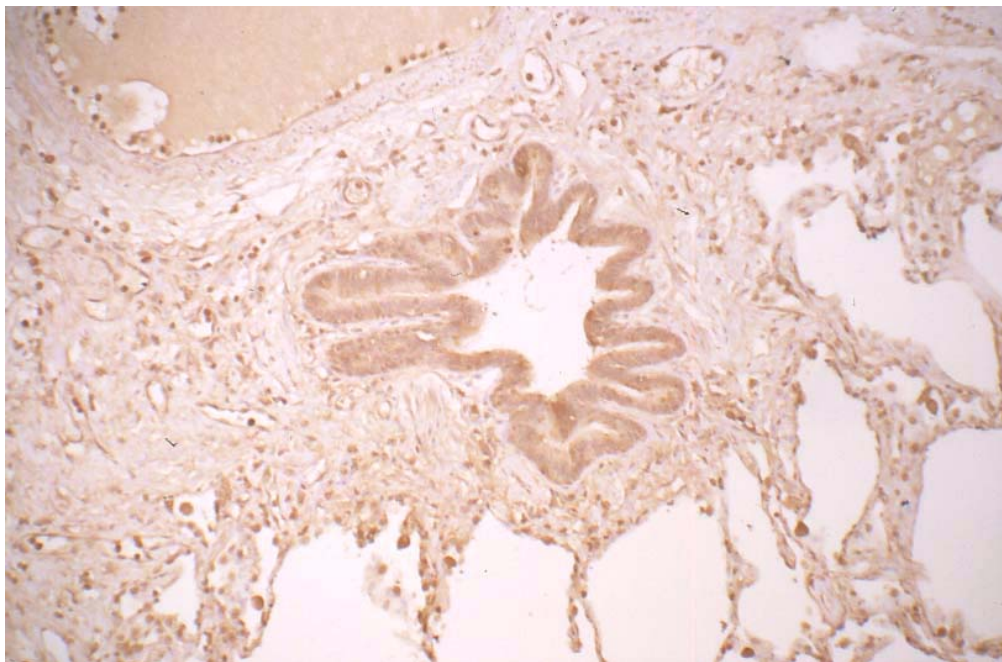


Abb. 9 Mensch, Bronchiolus, LL-37, mittelstarke Reaktion im Bronchiolarepithel, 125fach



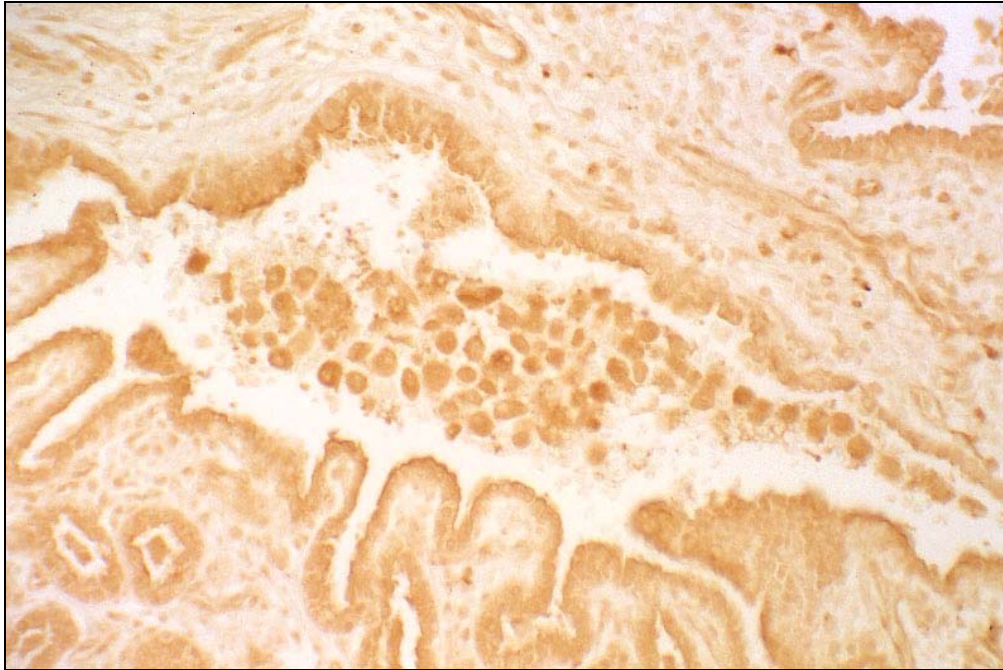


Abb.10 Mensch, Bronchiolus, Mukoviszidose, LL-37, positives Epithel; im Lumen positiv reagierende Makrophagen, 250fach

Im Alveolarbereich exprimierten die Alveolarmakrophagen die 3 untersuchten Peptide kräftig (siehe Abbildung 11, 12). Die Ergebnisse am Alveolarepithel waren recht variabel (hBD-1, LL-37), oft ergab sich eine sehr zarte Anfärbung (hBD-1), vielfach war die Reaktion aber mittelstark (LL-37, Abb. 12, 13), bei hBD-2 und oft auch bei LL-37 reagierten eindeutig auch die Pneumozyten II (Abb. 13). Bei den mitunter positiv reagierenden Knorpelzellen muss in einer eigenen Studie geprüft werden, ob es sich um eine unspezifische Kreuzreaktion handelt. Die glatten Muskelzellen der Blutgefäße färbten sich ebenfalls an, und zwar schwach mit hBD-2 und schwach bis mittelstark mit LL-37.

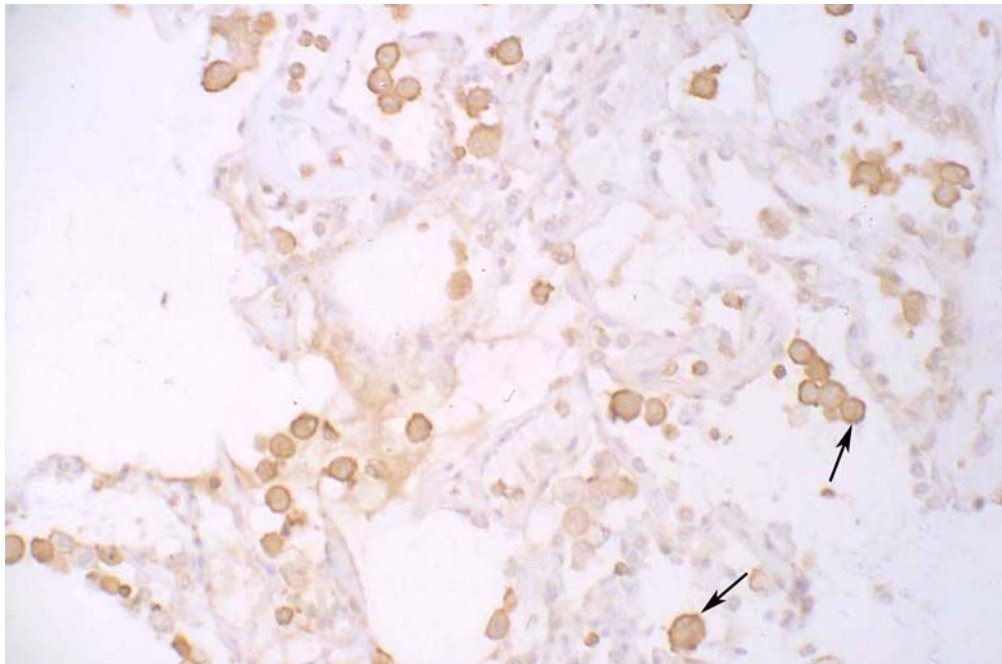


Abb. 11 Mensch, Lunge, Alveolen, hBD-1, kräftig positiv reagierende Makrophagen (Pfeile), 250fach

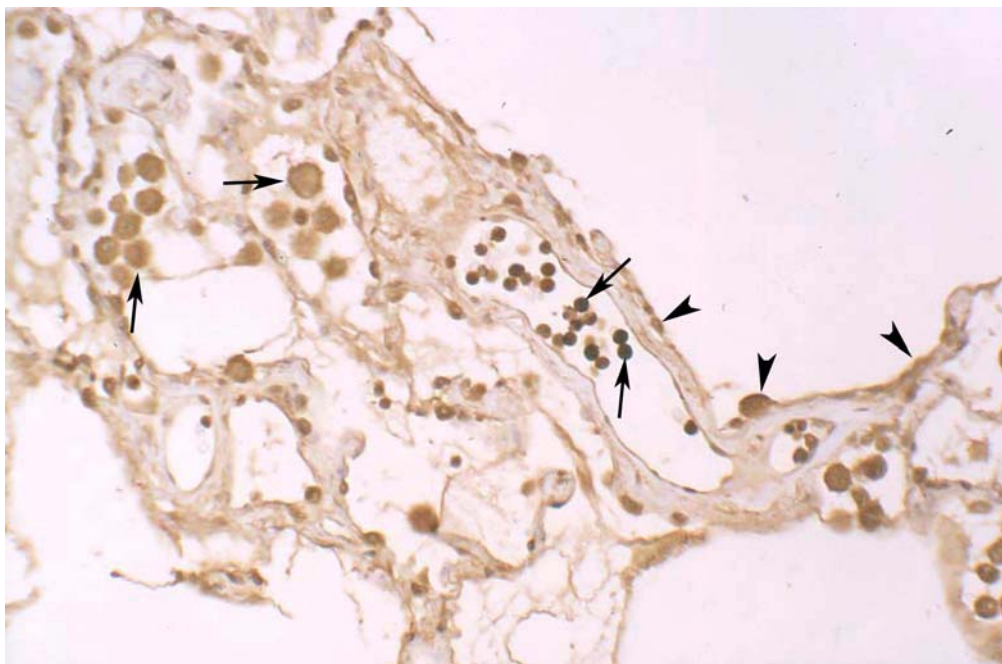


Abb. 12 Mensch, Lunge, Alveolen, LL-37, kräftig positive Reaktion in Makrophagen, (große Zellen, Pfeile) und T-Lymphozyten (kleine Zellen, Pfeile), positive Reaktion auch im Alveolarepithel (Pfeilköpfe), 250fach



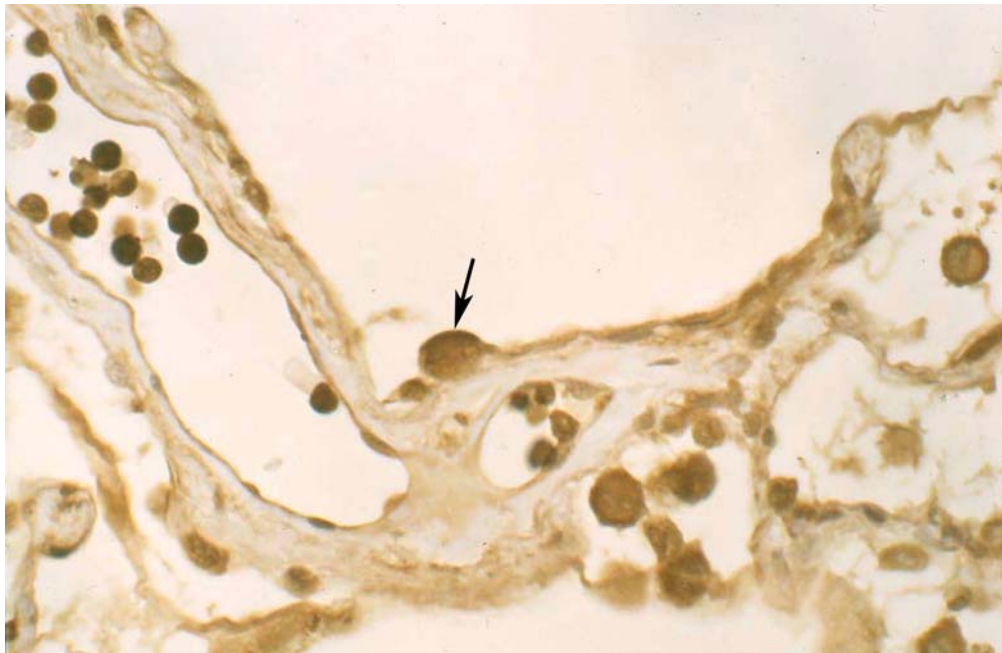


Abb. 13 Mensch, Lunge Alveolen), LL-37, positiv reagierender Pneumozyt II (Pfeil), 500fach

Insgesamt färbte sich das Epithel in den proximaleren Teilen der Atemwege immer intensiver als in den distalen.

## **B) Verdauungstrakt**

### **1. Ösophagus**

Das Oberflächenepithel exprimierte im Bereich der Becherzellen die 3 Peptide schwach positiv (Abb. 14). In den Oesophagusdrüsen waren vor allem die Gangepithelien mit hBD-2 in der 1:100-Verdünnung mittelstark angefärbt (siehe Abb. 15). Alle Gangepithelien zeigten die gleiche Färbungsintensität, auch die Intensität innerhalb einer Zelle war gleichmäßig. Bei hBD-1 und LL-37 waren die Gänge negativ. Bei erkennbarer Entzündung (Abb. 14) reagierten die Gangepithelien bei LL-37 aber auch positiv.

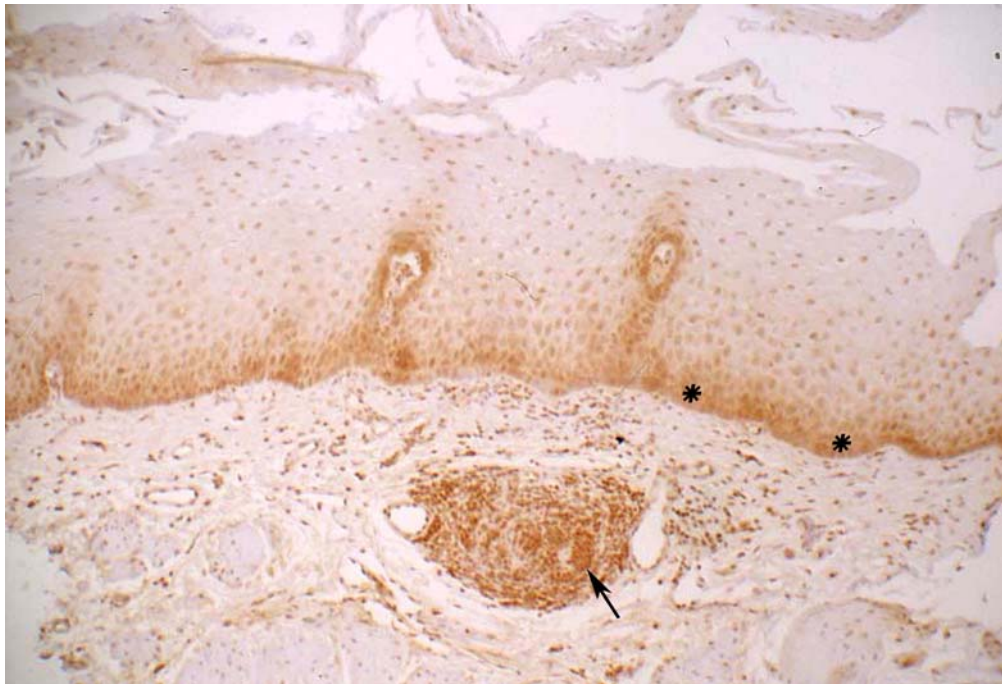


Abb. 14 Mensch, Oesophagus, LL-37, positive Reaktion vor allem in den basalen Bereichen des Epithels (Sternchen), in freien subepithelialen Zellen und im Gangepithel von Bronchialdrüsen (Pfeil); diese Gänge reagierten mit LL-37 bei Entzündungen in der Umgebung positiv, 125fach

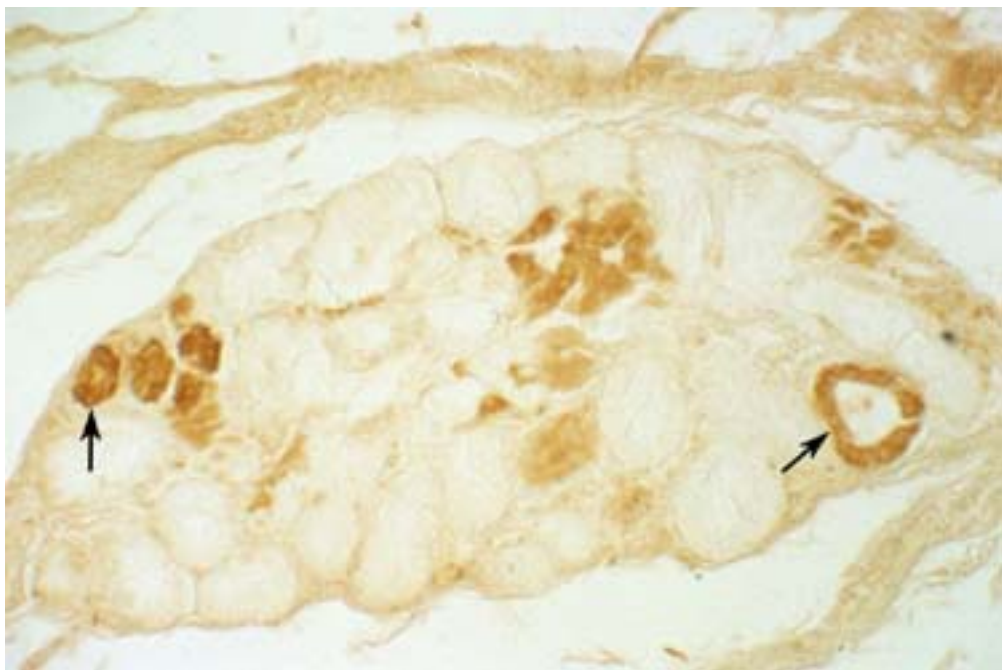


Abb. 15 Mensch, Oesophagus, Drüsen, hBD-2, positive Reaktion im Epithel der Gänge (Pfeile), 250fach

### **Ganglienzellen des Auerbachschen- und Meissnerschen Plexus**

Interessanterweise fand sich mit hBD-1 im Allgemeinen eine positive Immunreaktion in den Perikaryen der Ganglienzellen (Abb. 16).

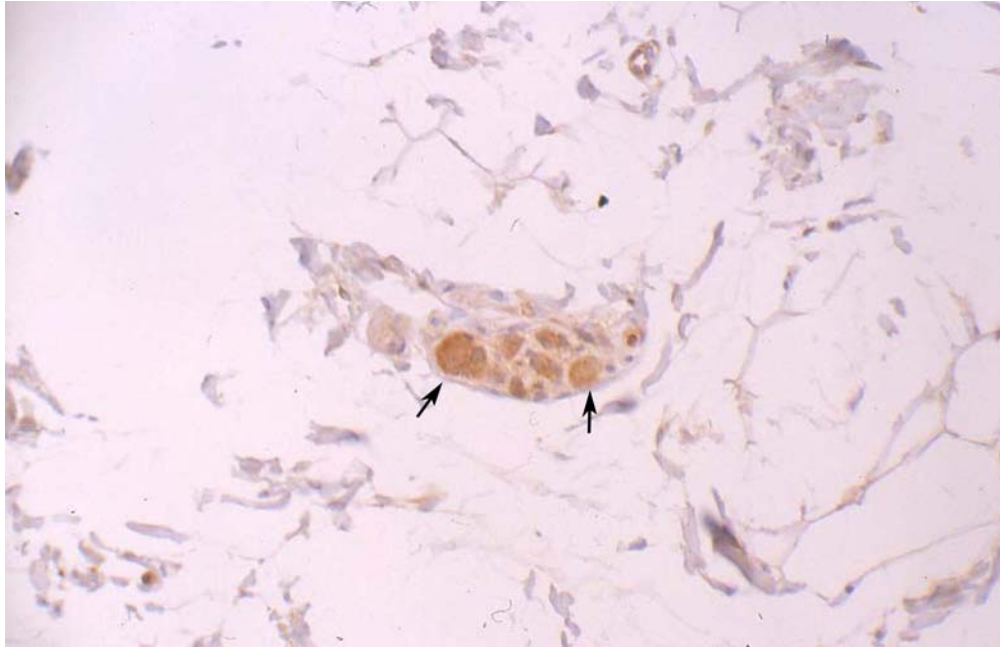


Abb. 16 Mensch, Colon, Meissner Plexus, hBD-1, interessanterweise zeigten die Ganglienzellen (Pfeile) der Nervenplexus (Auerbach und Meissner) im Darmrohr mit hBD-1 eine positive Reaktion, 250fach

## **2. Magen**

In den Magenproben (Fundus) war die Färbungsintensität im Oberflächenepithel der Schleimhaut für hBD-1 schwach bis mittelkräftig (siehe Abbildungen 17, 18). Auch für hBD-2 ergab sich ein positives Signal, für LL-37 bei beiden Verdünnungen ebenfalls. Die basal in den Drüsen gelegenen Hauptzellen färbten sich mittelstark (Abb. 19, 20, 21) an. Die Belegzellen im mittleren Teil der Drüsen färbten sich nicht oder nur sehr schwach an. Auch die glatten Muskelzellen der Blutgefäße der Submucosa reagierten mit LL-37.



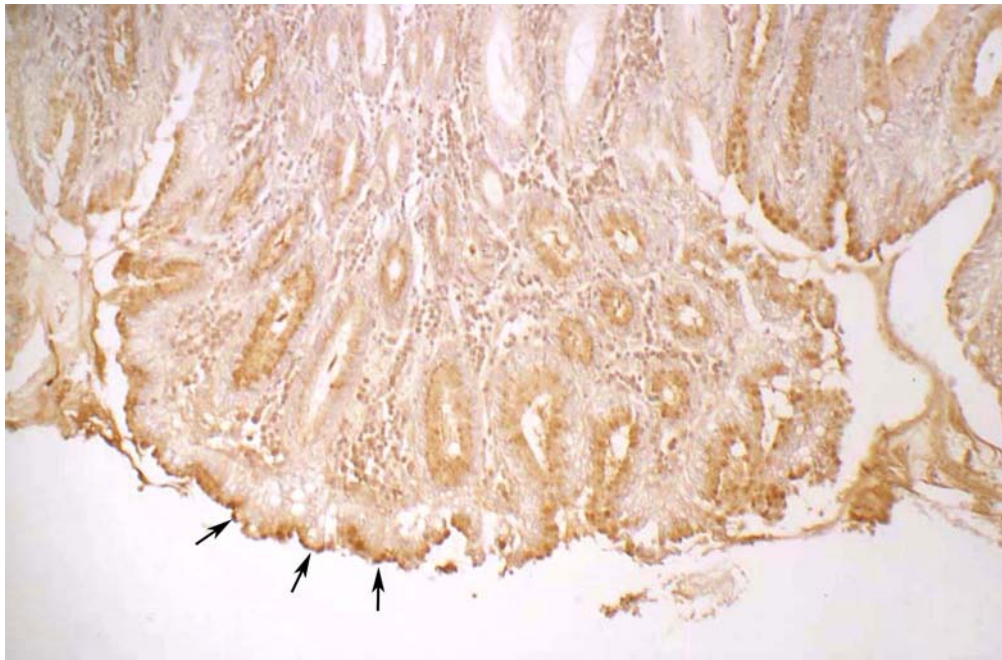


Abb. 17 Mensch, Magen, Corpus, Oberfläche und Foveolae, hBD-1, mittelstarke Reaktion apikal im Oberflächenepithel (Pfeile) und im Epithel der Foveolae, 125fach

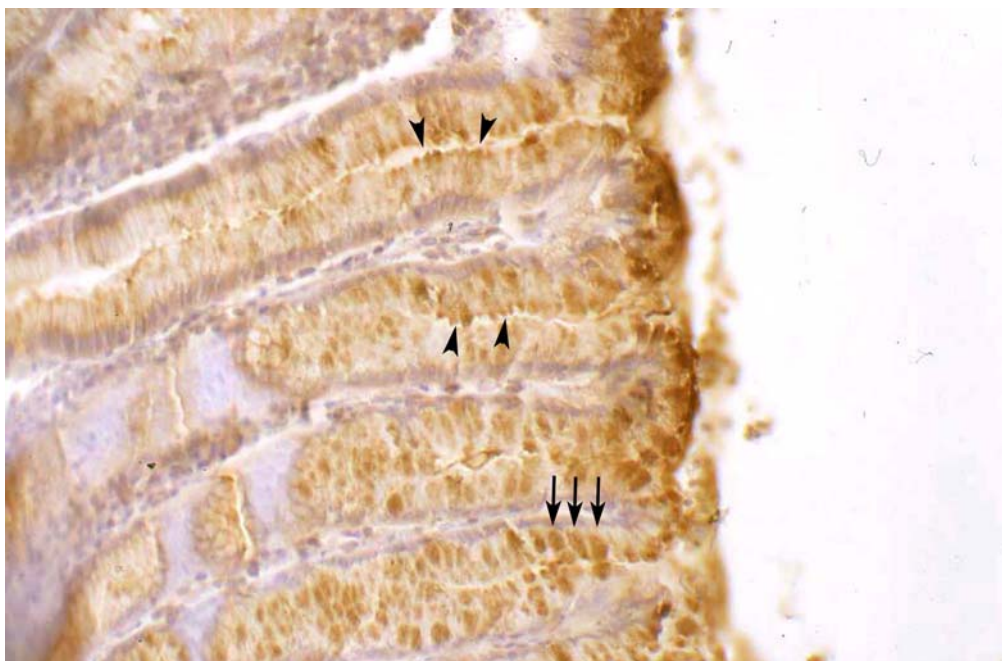


Abb. 18 Mensch, Magen, Corpus, Foveolae, hBD-1, positive Reaktion vor allem apikal im Oberflächenepithel (Pfeilköpfe), z. T. aber auch im gesamten Zytoplasma (Pfeile), 250fach

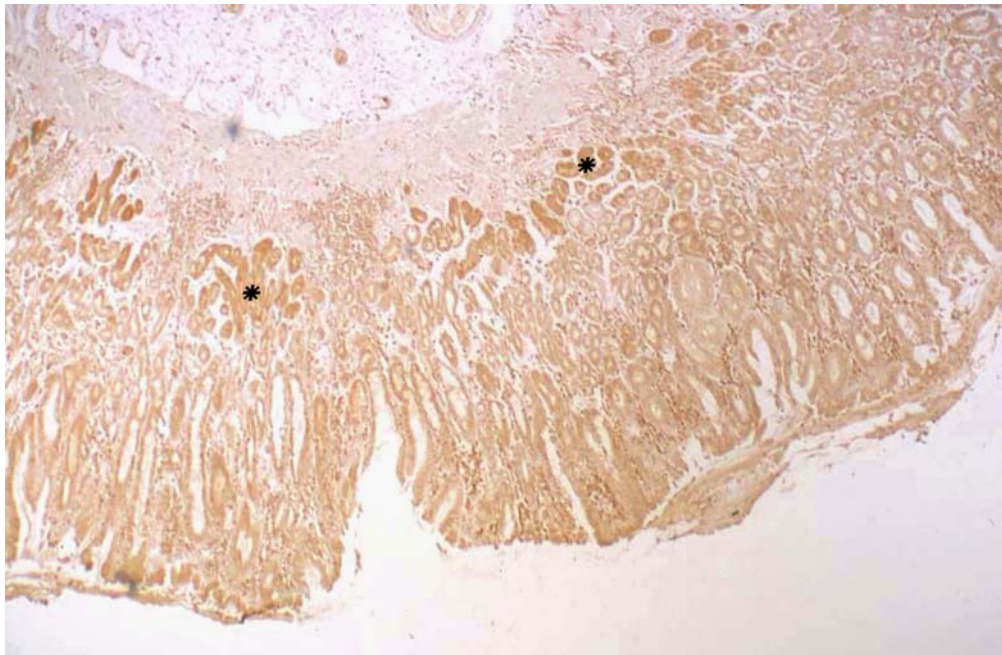


Abb. 19 Mensch, Magen, Corpus, LL-37, positive, mittelstarke Reaktion vor allem in den Hauptzellen (Sternchen), 50fach

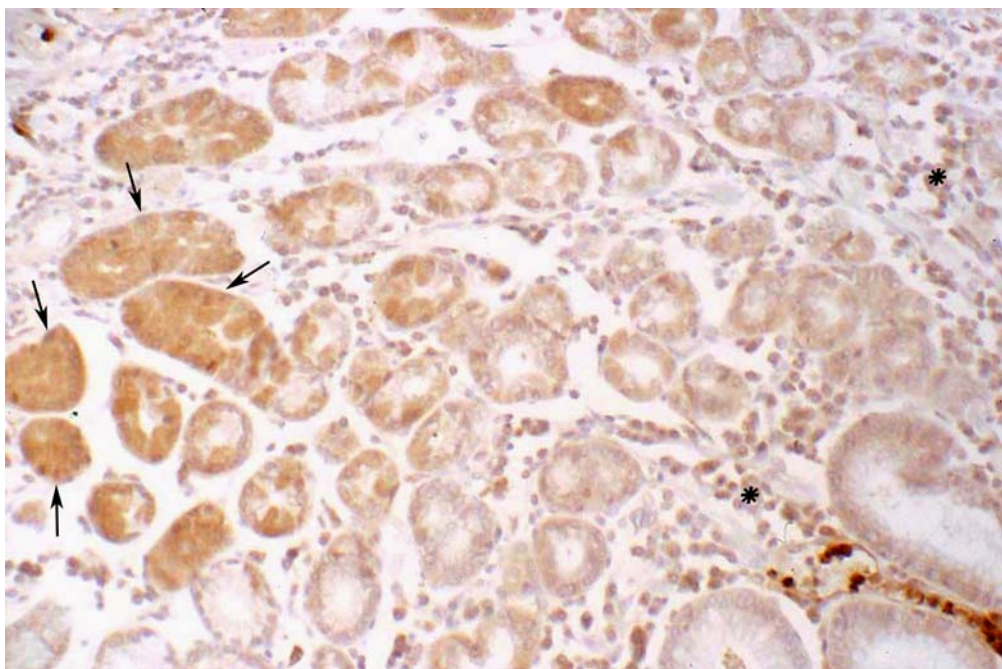


Abb. 20 Mensch, Magen, Corpus, LL-37, positiv reagieren insbesondere die Hauptzellen (Pfeile); positive Reaktion auch in zahlreichen freien Zellen der Lamina propria (Sternchen), 250fach



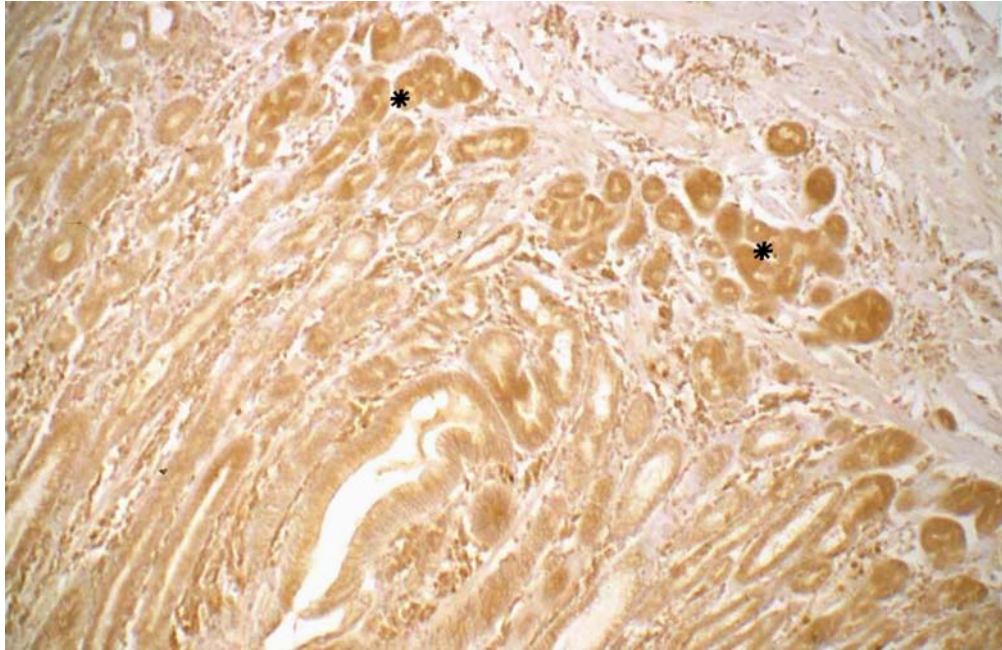


Abb. 21 Mensch, Magen, Corpus, LL-37, mittelkräftige Reaktion vor allem in den Hauptzellen (Sternchen), die basal in den Schleimhautdrüsen liegen, 125fach

### **3. Dünndarm**

Im Dünndarmepithel war die Signalintensität für alle drei Antikörper schwach bis stark. Stark war die Färbung vor allem in den Epithelzellen der Zotten. In den Krypten waren die Peptide nur sehr schwach exprimiert (Abb. 22). In den Panethzellen waren alle drei antimikrobiellen Peptide, wie bei den Rhesusaffen, mittelstark exprimiert, LL-37 reagierte in diesen Zellen am schwächsten. Die Becherzellen zeigten keine Anfärbung (Abb. 23).



Abb. 22 Mensch, Dünndarm, LL-37, positive Reaktion im Zottenepithel; sehr schwache bis negative Reaktion in den Krypten (Sternchen), 125fach

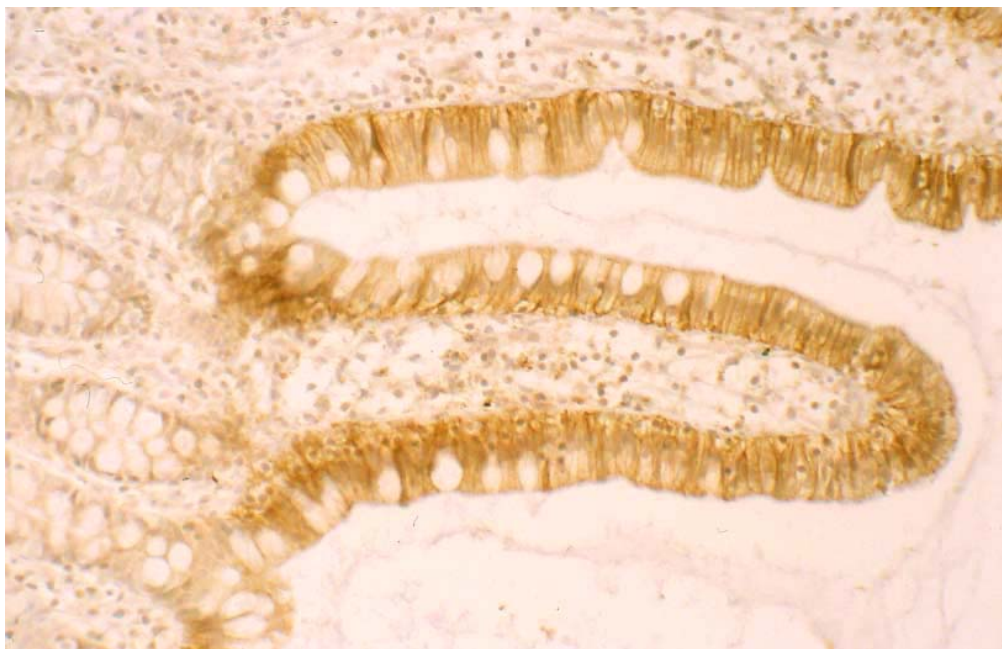


Abb. 23 Mensch, Dünndarm, LL-37, mittelstarke Reaktion in den Enterozyten der Zotten, 250fach

#### **4. Colon**

Im Colon ergab sich ebenfalls für beide Verdünnungen aller Antikörper ein schwaches bis starkes positives Signal, und zwar im Oberflächenepithel und in den Krypten (Abb. 24,

25). Das positive Signal war vor allem im basalen und oft auch im apikalen Bereich der Epithelzellen erkennbar, bei hBD-1 war manchmal nur der apikale Teil, manchmal die ganze Zelle angefärbt. Die Zellen im mittleren Bereich der Krypten waren manchmal stärker angefärbt als die restlichen Drüsenregionen (Abb. 26). Das Oberflächenepithel färbte sich meistens mittelstark an (Abb. 27). Einzelne Muskelzellen der Lamina muscularis mucosae und Tunica muscularis färbten sich ebenfalls intensiv an. Auch in den Ganglienzellen des Auerbachschen- und Meissnerschen Plexus des Colons fand sich oft mit hBD-1 eine positive Immunreaktion (Abb. 16). Diese Reaktion färbt das gesamte Zytoplasma der Perikaryen schwach bis mittelstark an.



Abb. 24 Mensch, Colon, LL-37, hier mittelstarke epitheliale Reaktion; zahlreiche freie Zellen in der Lamina propria reagieren ebenfalls positiv, 125fach





Abb. 25 Mensch, Colon, LL-37, hier eher schwache epitheliale Reaktion, 125fach

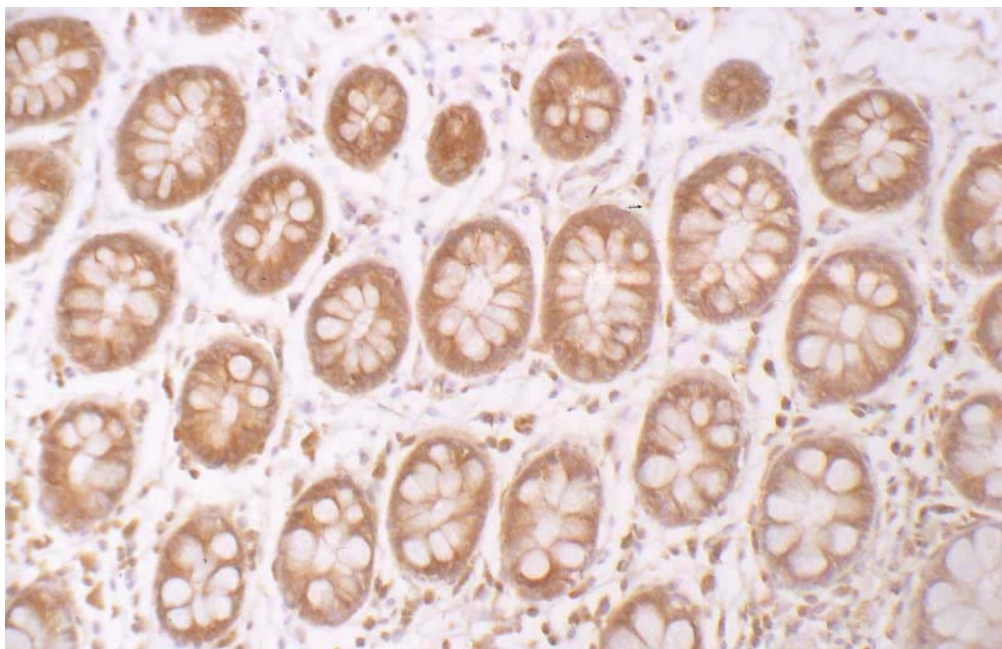


Abb. 26 Mensch, Colon, quer geschnittene Krypten, hBD-1, mittelstarke Reaktion in den Enterozyten, Becherzellen negativ, 250fach



Abb. 27 Mensch, Colon, LL-37, im abgebildeten Präparat reagieren die Oberflächenepithelzellen stärker als die Kryptenzellen, die Becherzellen sind generell negativ, 250fach

## **5. Pankreas**

Im Pankreas zeigten die Azini generell eine schwache und die Gangstrukturen eine schwache bis mittelstarke Expression der drei untersuchten Peptide.

### **C) Reproduktionstrakt**

In den Eierstöcken war die Färbungsintensität in den Follikelepithelzellen für die 1:100-Verdünnung für alle drei Antikörper schwach bis mittelstark.

In der Tube war das Signal in den Epithelzellen für hBD-2 mittelstark positiv und für LL-37 sogar mittelstark bis stark positiv (Abb. 28, 29). Innerhalb einer Zelle war die Färbung gleichmäßig.



Abb. 28 Mensch, Tube, LL-37, mittelstarke Reaktion im Tubenepithel (Pfeile), 50fach

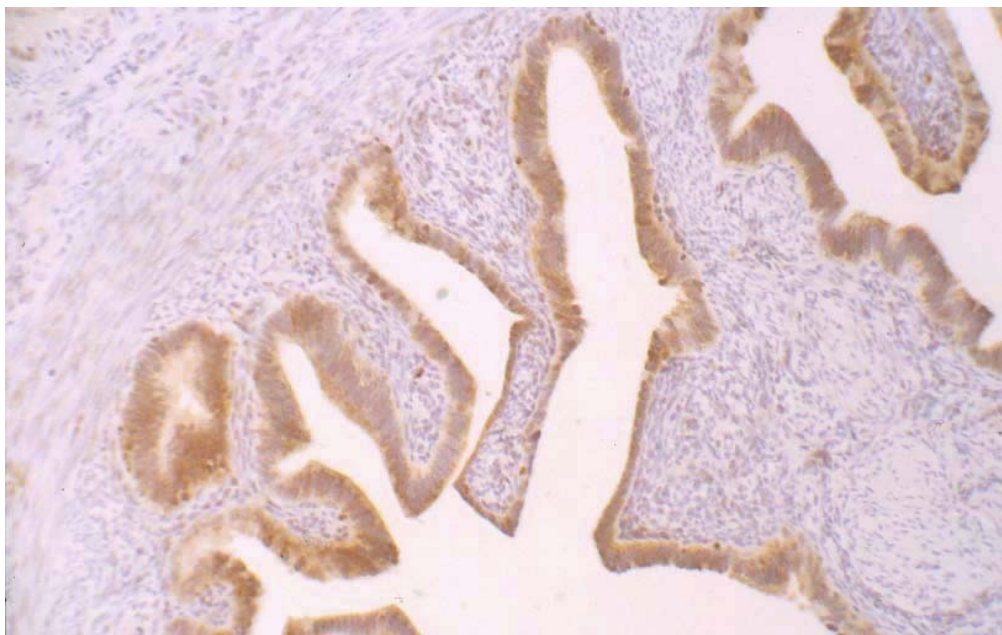


Abb. 29 Mensch, Tubenepithel, LL-37, mittelstarke Reaktion, 250fach

In der Cervix reagierten alle drei Peptide im Drüsenepithel generell mittelstark (LL-37) bis stark (hBD-1 und hBD-2) positiv (siehe Abb. 30), einige wenige Zellen zeigten ein noch intensiveres Signal als die übrigen. Bei LL-37 fand sich ein kleiner Bereich im apikalen Teil fast aller Drüsenzellen, der stärker angefärbt war als der basale Zellteil.



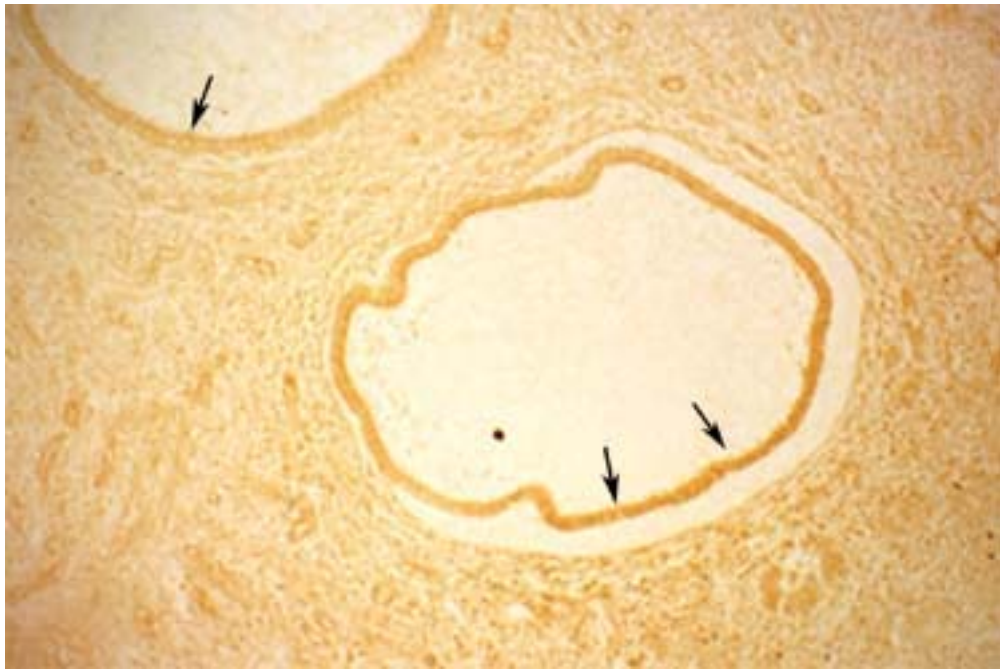


Abb. 30 Mensch Zervix, LL-37, positive Reaktion in den Drüsenzellen des Zervixepithels (Pfeile), 250fach

#### **D) Samenstrang**

Im Samenstrang blieben alle Reaktionen negativ, lediglich in der glatten Muskulatur ergaben sich schwach positive Anfärbungen.

#### **E) Mamma**

Die Epithelzellen der Endstücke exprimieren die drei untersuchten antimikrobiellen Peptide generell in schwachem Ausmaß. Jedoch fanden sich bei hBD-2 und LL-37 auch immer einzelne Epithelzellen oder ganze Endstücke, die mittelstark reagierten. Die Myoepithelzellen der Endstücke färbten sich mit hBD-1 und hBD-2 vielfach mittelkräftig an. Die interlobulären Gänge reagieren im Allgemeinen auch nur schwach, jedoch ist in den an das Lumen grenzenden Epithelzellen die Apikalregion meistens mittelkräftig angefärbt. Das Endothel der Blut- und Lymphgefäße exprimiert LL-37 mittelstark.

#### **F) Niere und ableitende Harnwege**

In der Niere färbten sich die Sammelrohre, die proximalen und distalen Tubuli für alle drei Antikörper in der 1:100-Verdünnung an. In den Glomeruli exprimierten die Podozyten hBD-1 und meist etwas kräftiger hBD-2 (Abb. 31, 32). Das Epithel der proximalen Tubuli

reagierte mit den Antikörpern gegen alle drei Peptide im Allgemeinen schwach. Die Färbungsintensität war in den distalen Tubuli meistens deutlich stärker, alle Zellen dieser Tubuli färbten sich gleichmäßig an. Am kräftigsten wurde im Allgemeinen hBD-2 exprimiert (Abb. 32, 33, 34, 35, 36). Die Epithelzellen der Sammelrohre zeigten ebenfalls eine mittelstarke bis starke positive Reaktion (Abb. 37 und 38). In einigen Lumina der Sammelrohre färbte sich homogenes Material intensiv positiv an, am stärksten für LL-37. Bei der höheren Verdünnung war für hBD-2 das Signal in den Sammelrohren etwas schwächer, bei LL-37 und hBD-1 gleich stark. Im Falle des hBD-1 zeigten die Sammelrohre ein differenziertes Färbemuster, und das sowohl in den Markstrahlen als auch in den größeren Sammelrohren der Markpyramiden. Hier färbten sich einzelne Epithelzellen deutlich kräftiger an als ihre Umgebung (Abb. 37, 38, 39, 40). Es handelt sich vermutlich um die Schaltzellen. Die glatten Muskelzellen der Blutgefäße färbten sich mit hBD-1 teilweise an.

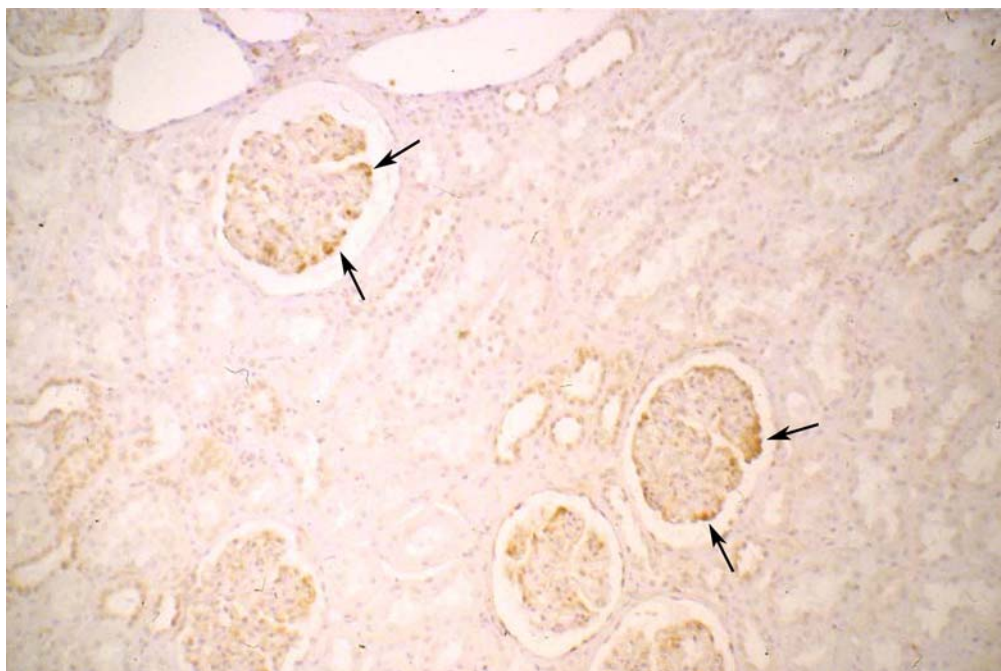


Abb. 31 Mensch, Niere, Glomeruli, hBD-1, positive Reaktion in den Podozyten der Glomeruli (Pfeile), 125fach

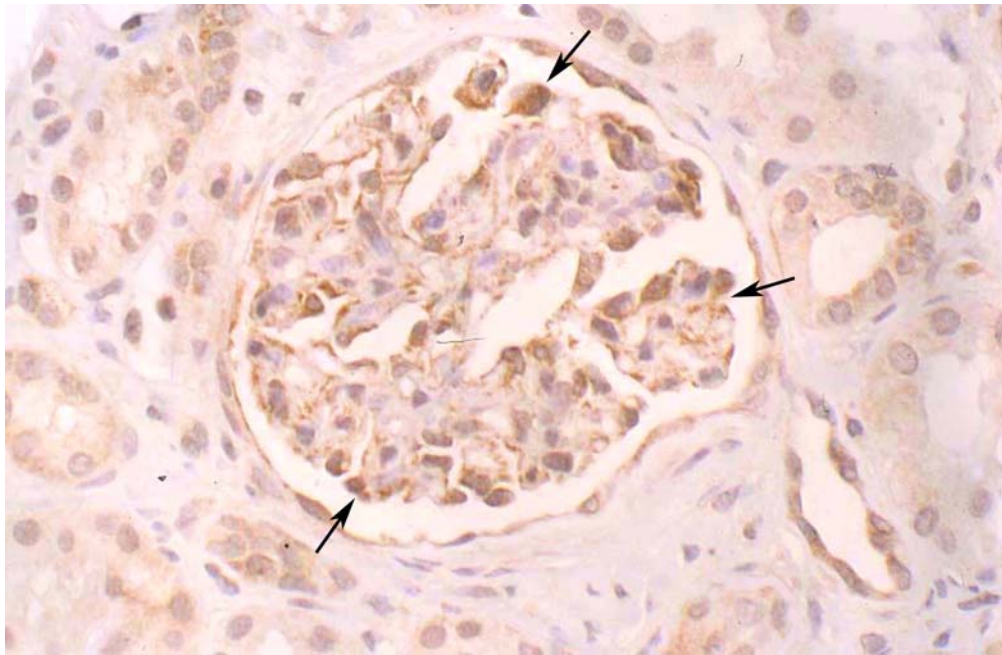


Abb. 32 Mensch, Niere, Glomerulus, hBD-2, positive Reaktion in den Podozyten (Pfeile), 500fach

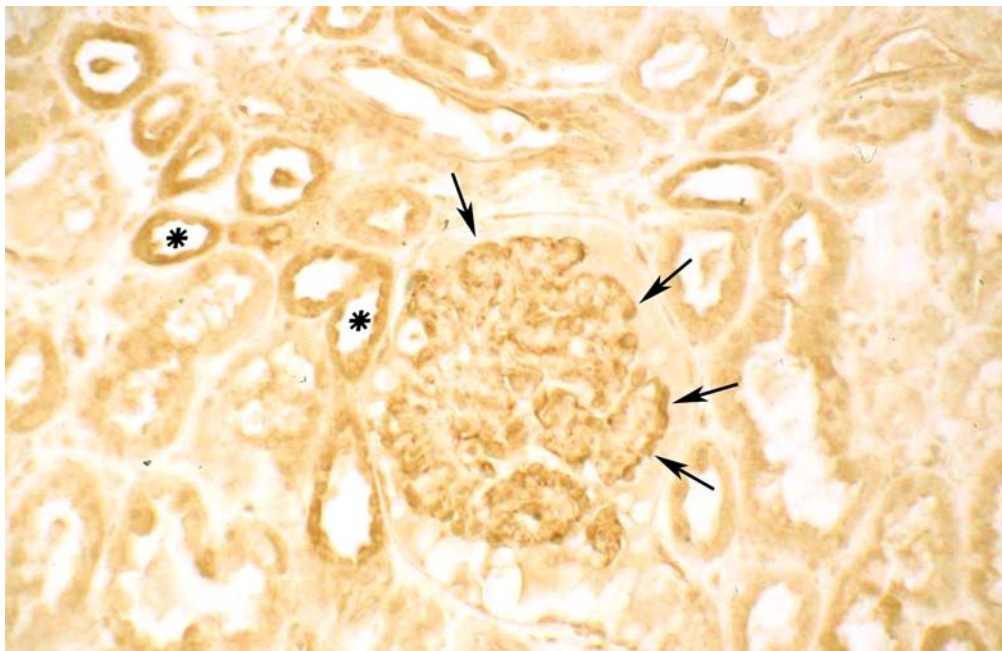


Abb. 33 Mensch, Niere, Glomerulus, hBD-2, mittelstarke Reaktion im Epithel der distalen Tubuli (Sternchen) und in den Podozyten der Glomeruli (Pfeile), 250fach



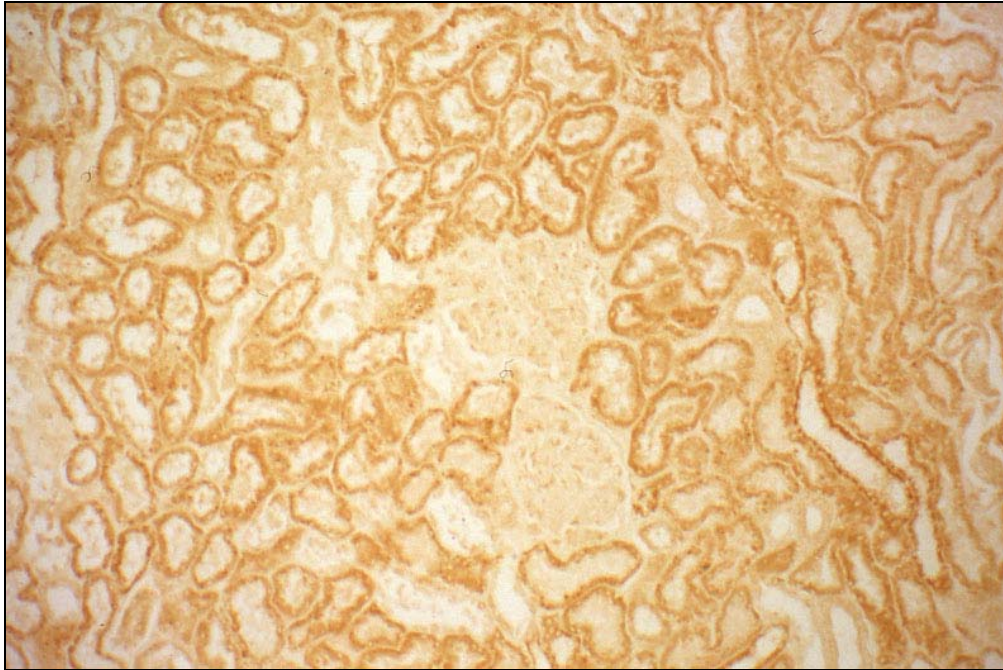


Abb. 34 Mensch, Niere, hBD-2, mittelstarke Reaktion in den distalen Tubuli und corticalen Sammelrohren, 125fach

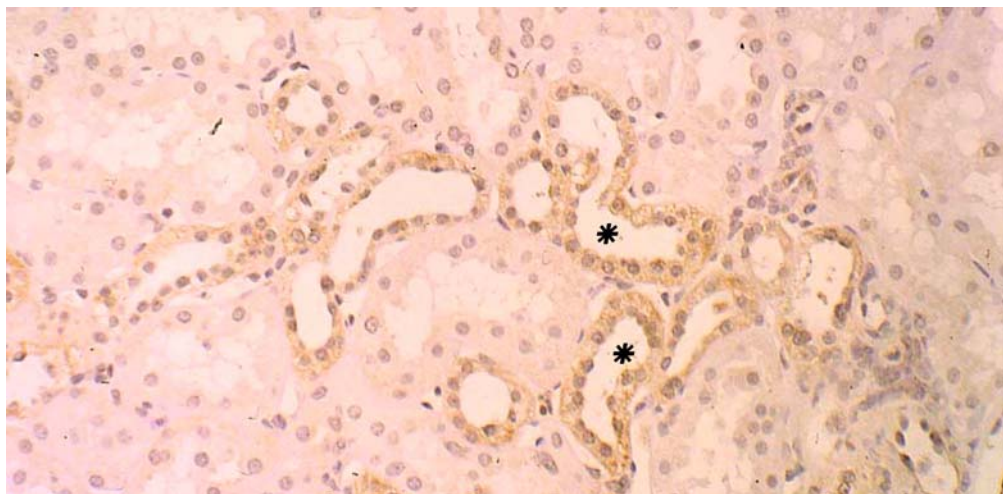


Abb. 35 Mensch, Niere, hBD-2, schwache bis mittelstarke Reaktion in distalen Tubuli, 250fach

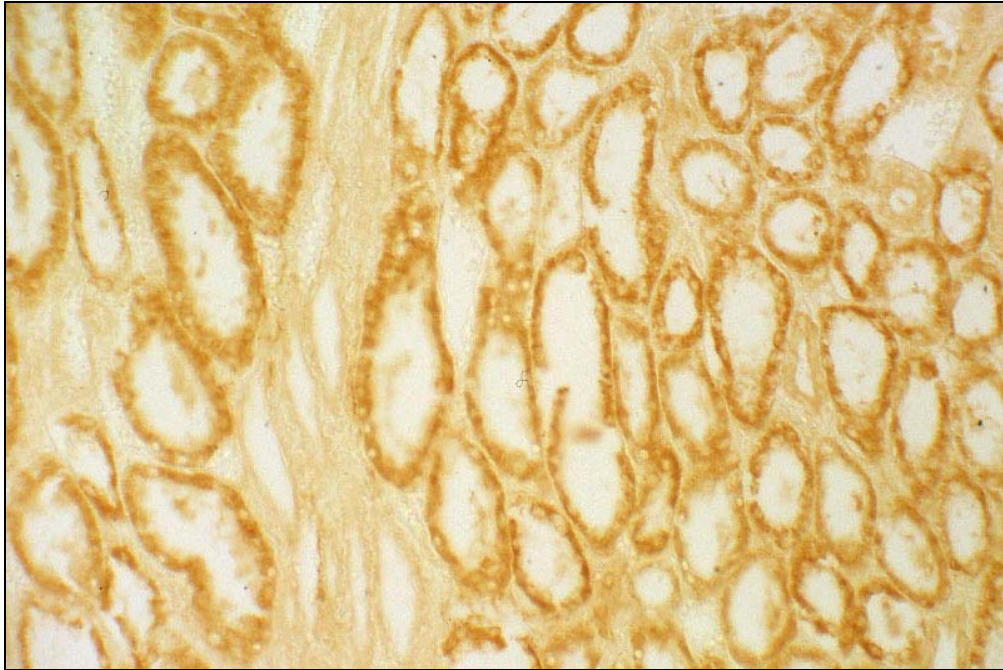


Abb. 36 Mensch, Niere, hBD-2, Region mit vielen positiv reagierenden distalen Tubuli, 250fach

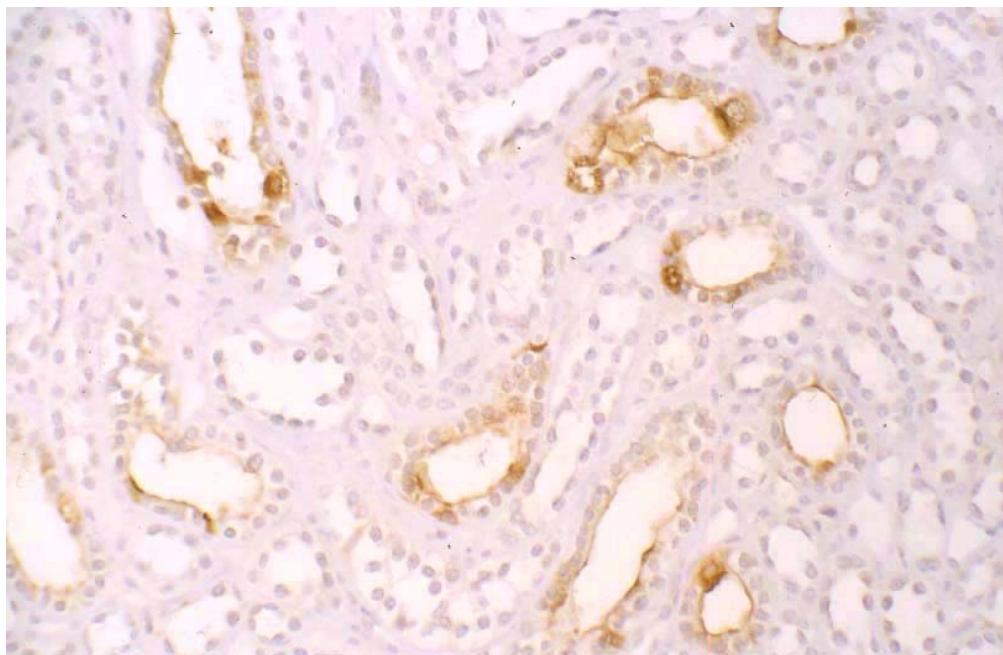


Abb. 37 Mensch, Niere, Sammelrohre, hBD-1, im Epithel der Sammelrohre exprimieren einzelne Epithelzellen, vermutlich die Schaltzellen, hBD-1 besonders kräftig, 250fach





Abb. 38 Mensch, Niere, Sammelrohre, hBD-1, einzelne positiv reagierende Epithelzellen, 125fach

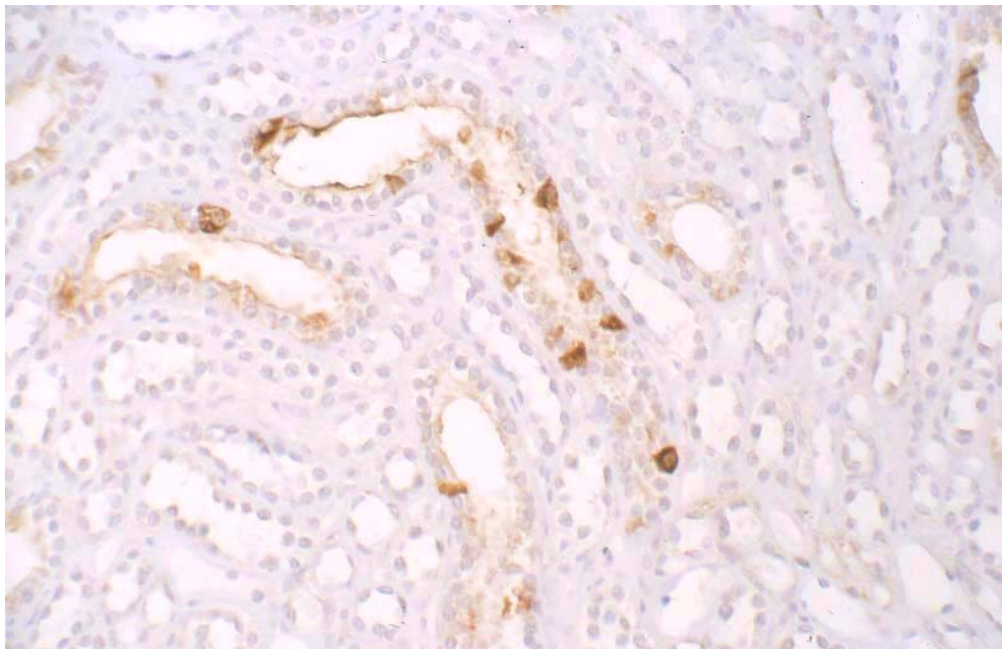


Abb. 39 Mensch, Niere, Sammelrohre, hBD-1, einzelne positiv reagierende Epithelzellen, 250fach

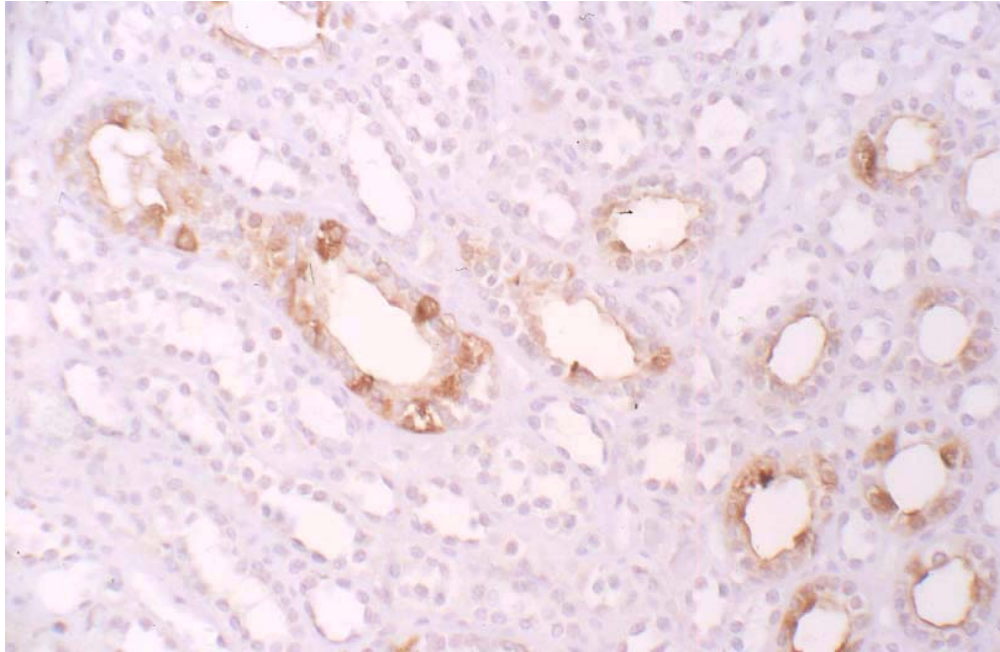


Abb. 40 Mensch, Niere, Sammelrohre, hBD-1, beachte die gut erkennbaren Einzelzellen im Epithel, die positiv reagieren, 250fach

In den ableitenden Harnwegen des Menschen wurden die untersuchten Peptide in gleicher Weise wie beim Rhesusaffen exprimiert (siehe dortige Abbildungen).

### **G) Plexus choroideus**

Im Plexus choroideus färbten sich die Epithelzellen mit schwacher (hBD-1) bis mittelstarker (hBD-2, LL-37) Intensität für alle drei Antikörper an. Einzelne Zellen reagierten stärker als andere (siehe Abb. 41 bis 43). Unter diesen Zellen zeigte sich keine Präferenz für eine bestimmte Region auf den Plexuszotten.

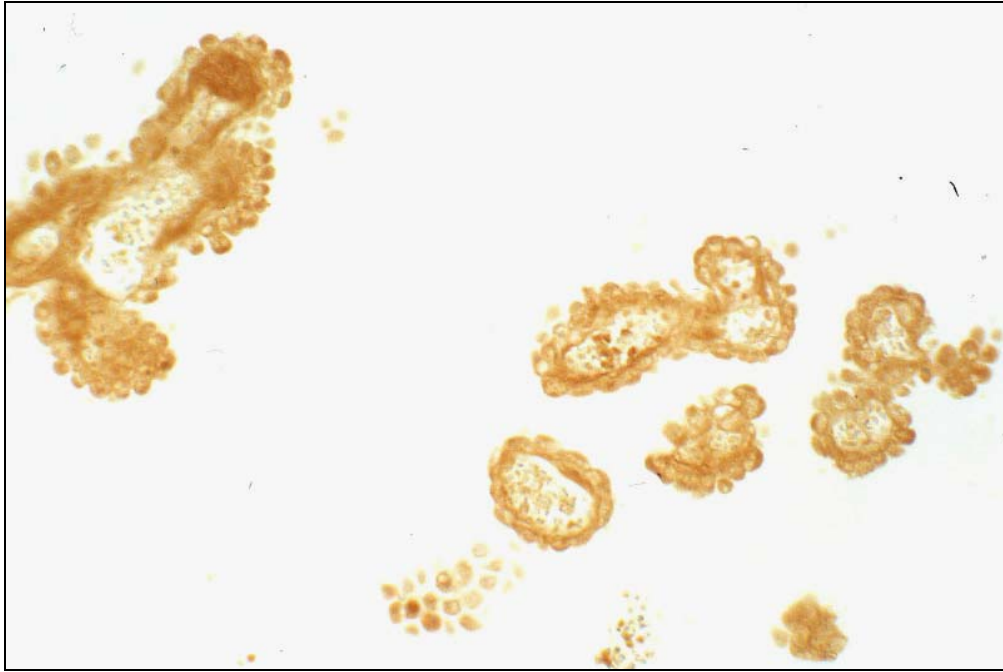


Abb. 41 Mensch, Plexus choroideus, hBD-1, 250fach

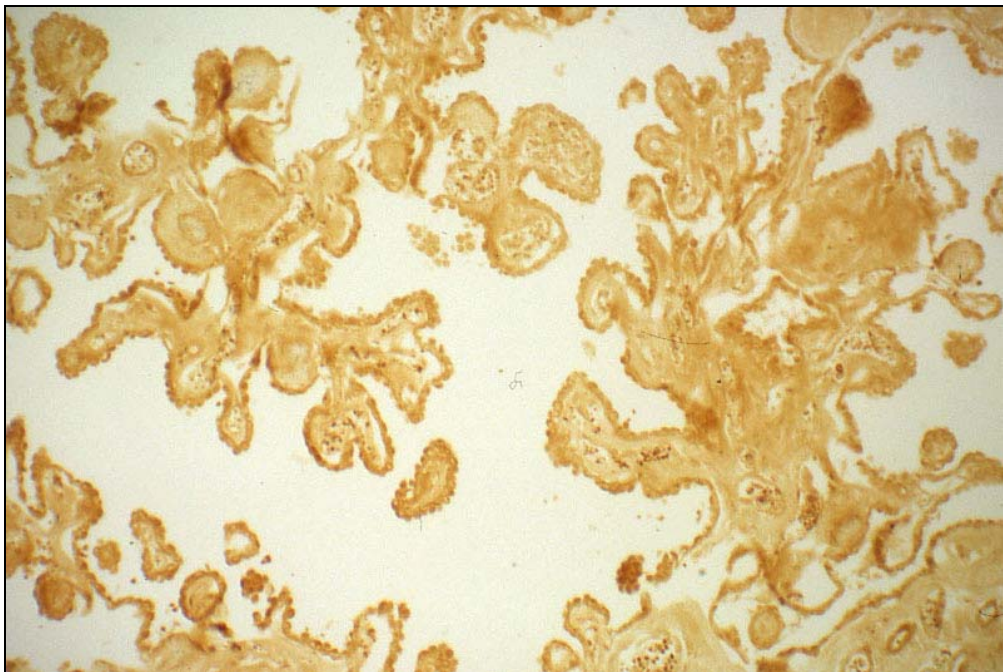


Abb. 42 Mensch, Plexus choroideus, hBD-2, 125fach



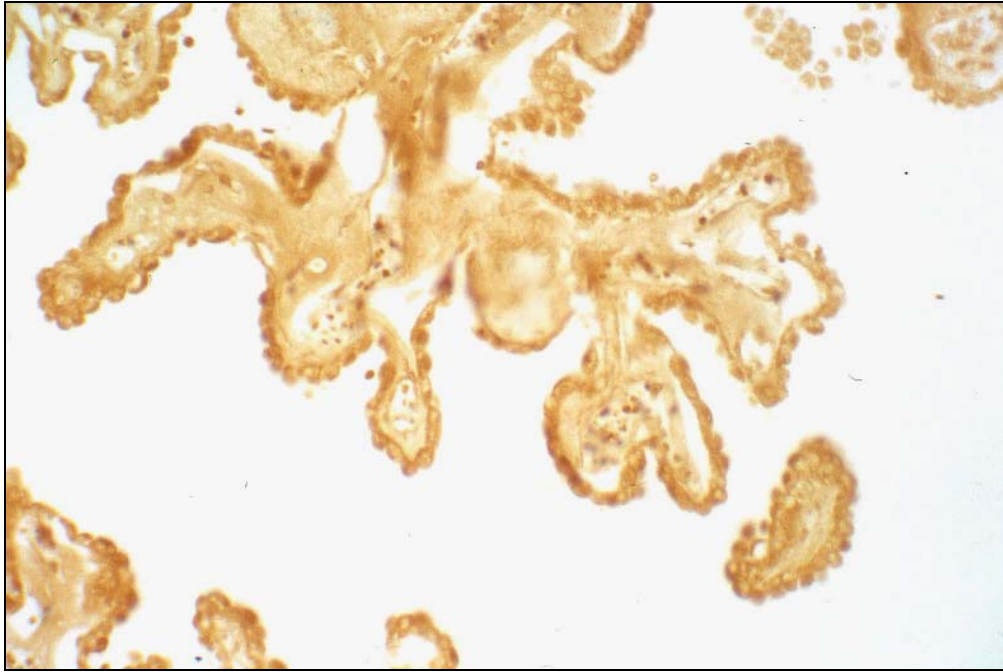


Abb. 43 Mensch, Plexus choroideus, hBD-2, 250fach

#### **H) Epidermis**

Bei den Hautproben färbten sich die Zellen der Epidermis für jeden Antikörper mittelstark an (siehe Abb. 44 für die Reaktion mit hBD-2). Ein gleichmäßig recht kräftiges, positives Signal zeigten auch die Schweißdrüsen (siehe Abb. 45 und 46). Innerhalb dieser Drüsen färbten sich wahrscheinlich vor allem die dunklen Zellen (Abb. 46) an, es zeigte sich teilweise eine Präferenz für den basalen Teil bestimmter Zellen. Auch die apokrinen Duftdrüsen färbten sich an. Die Reaktion in den Schweißdrüsen war z. T. schwer zu beurteilen, öfter reagierte der Bereich der äußersten Peripherie der Zellen kräftig positiv. Ob es sich bei dieser so gut wie membranständigen Reaktion um eine echte Reaktion handelt, bleibt offen. Die vaskulären Glomeruli, Strukturen, in denen sich Arteriolen und Venolen verbinden, und die umgebenden Zellen waren ebenfalls positiv.



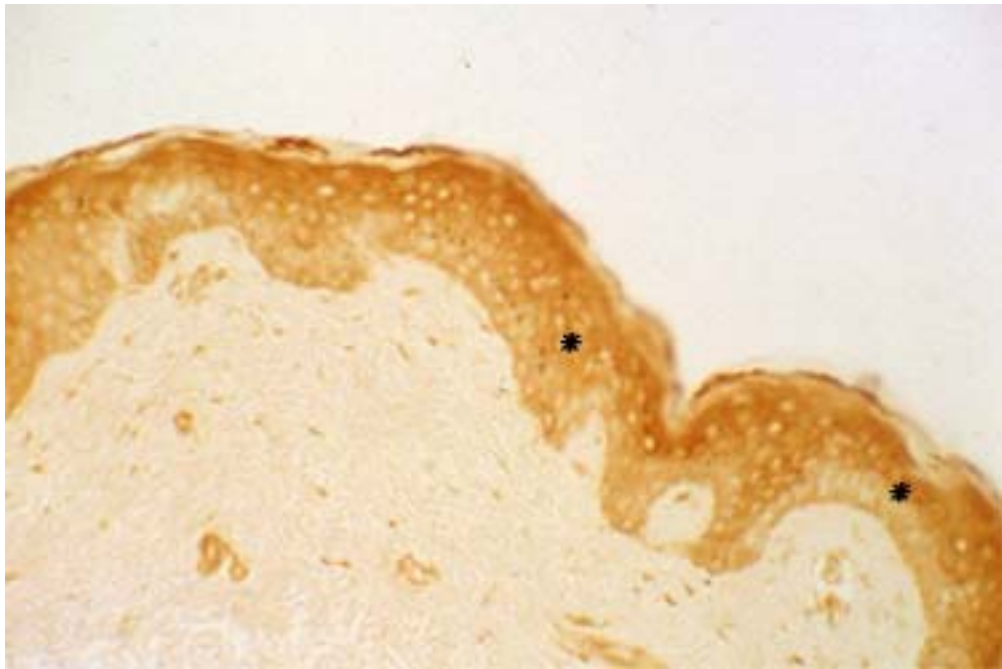


Abb. 44 Mensch, Haut, hBD-2, positive Reaktion in der Epidermis (Sternchen), die am kräftigsten im Bereich des Stratum granulosum ist, 250fach

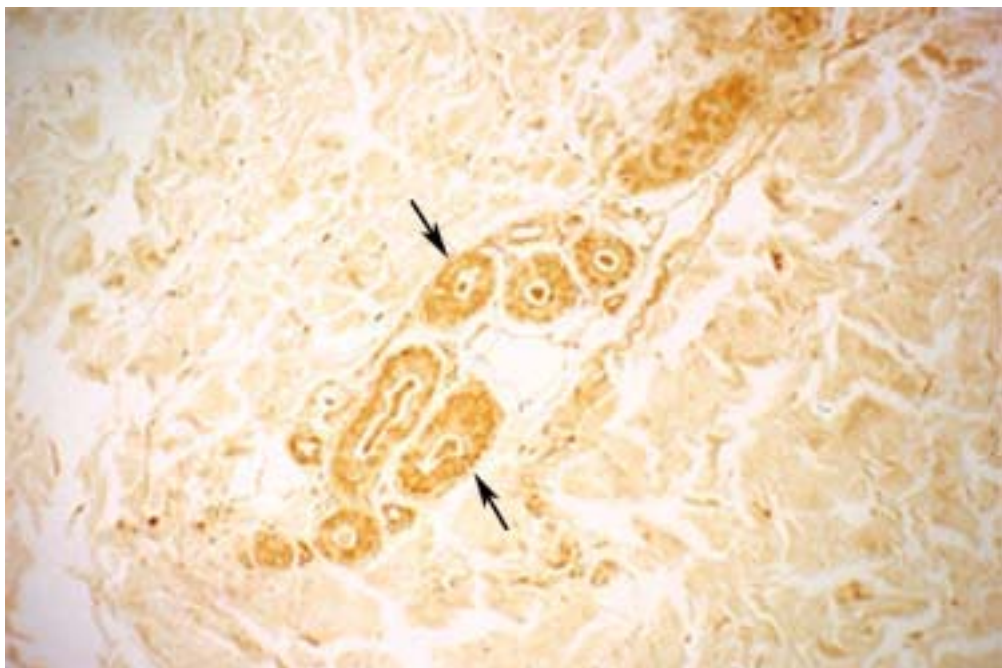


Abb. 45 Mensch, Haut, hBD-1, positive Reaktion in den Schweißdrüsen (Pfeile), 125fach

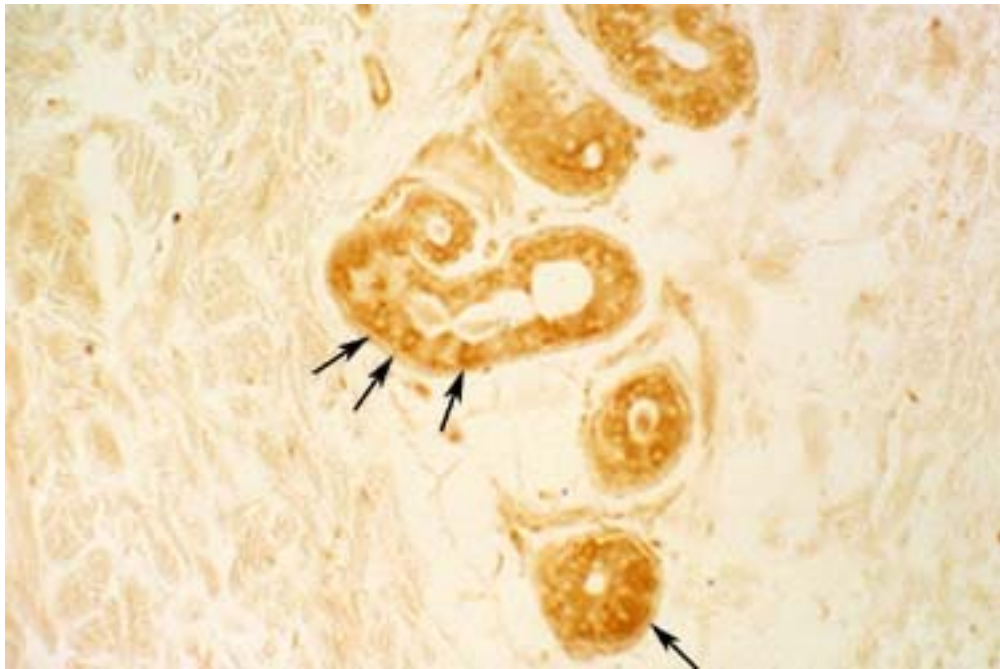


Abb. 46 Mensch, Haut, hBD-2, Pfeile weisen auf einzelne besonders stark reagierende Zellen, bei denen es sich wahrscheinlich um die sog. dunklen Epithelzellen handelt, 250fach

Leber, Portalvene und Milz zeigten keinerlei positives Signal, nur eine schwache Hintergrundfärbung. Auch bei Knochenmark zeigte sich kein positives Signal.

Im Folgenden findet sich eine kurze Zusammenfassung der Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen mit hBD-1, hBD-2 und LL-37 an verschiedenen Geweben des Menschen (Tabellen 2 bis 6). Es wurde jeweils die optimalste Verdünnung mit maximalem positivem Signal und geringer Hintergrundfärbung ausgewählt.

## Tabelle 2

Tabellenübersicht Mensch: Zusammenfassung der Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung mit hBD-1, hBD-2 und LL-37 an Epithelien der Atemwege des Menschen

Signal: kein Signal (0) – schwach (+) – mittel (++) – stark (+++) – sehr stark (++++)

++/+++Organ	Antikörper	Signal
hBD-1 1:100 Nasenmuschel, Epithel	hBD-2 1:100	+/++++
	LL-37 1:100	+++
Trachea, Epithel	hBD-1 1:100	++
	hBD-2 1:100	++
	LL-37 1:100	++
Bronchien, gesund	hBD-1 1:100	++
	hBD-2 1:50	++
	LL-37 1:100	+/++
Bronchien, Mukoviszidose	hBD-1 1:100	++/++++
	hBD-2 1:100	+++
	LL-37 1:100	+++
Bronchien, Pneumonie	hBD-1 1:100	++/++++
	hBD-2 1:50	++
	LL-37 1:100	+
Bronchien, Emphysem	hBD-1 1:100	++/+++++
	hBD-2 1:50	++/++++
	LL-37 1:100	++
Bronchiolen, gesund	hBD-1 1:100	+
	hBD-2 1:50	++
	LL-37 1:100	++
Seröse Drüsen- zellen in Trachea und Bronchien	hBD-1 1:100	++
	hBD-2 1:50	++
	LL-37 1:100	++

### Tabelle 3

Tabellenübersicht Mensch: Zusammenfassung der Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung mit hBD-1, hBD-2 und LL-37 an Epithelien des Gastrointestinaltrakts

Signal: kein Signal (0) – schwach (+) – mittel (++) – stark (+++) – sehr stark (++++)

Organ	Antikörper	Signal
Ösophagus, Epithel	hBD-1 1:100	+
	hBD-2 1:100	+
	LL-37 1:100	+
Ösophagus, Drüsen, Ausführungsgänge	hBD-1 1:100	0
	hBD-2 1:100	++
	LL-37 1:100	0
Magen, Oberflächenepithel	hBD-1 1:100	+/++++
	hBD-2 1:100	+/++
	LL-37 1:100	+/++
Magendrüsen, Hauptzellen	hBD-1 1:100	++/++++
	hBD-2 1:100	++
	LL-37 1:100	+/++
Dünndarmepithel, Zotten	hBD-1 1:100	++
	hBD-2 1:100	++
	LL-37 1:100	+
Panethzellen	hBD-1 1:100	++
	hBD-2 1:100	++
	LL-37 1:100	++
Colonepithel, Oberfläche, Krypten	hBD-1 1:100	+/++++
	hBD-2 1:100	+/++++
	LL-37 1:100	+/++++
Pankreas, Azini	hBD-1 1: 100	+
	hBD-2 1:100	+
	LL-37 1:100	+

## Tabelle 4

Tabellenübersicht Mensch: Zusammenfassung der Ergebnisse der immunhistochemischen  
Untersuchung mit hBD-1, hBD-2 und LL-37 an Mamma und Reproduktionstrakt

Signal: kein Signal (0) – schwach (+) – mittel (++) – stark (+++) – sehr stark (++++)

Organ	Antikörper	Signal
Mamma, Myoepithel	hBD-1 1:500	++
	hBD-2 1:500	++
	LL-37 1:100	0
Mamma, Drüsenepithel	hBD-1 1:500	+
	hBD-2 1:500	+ / ++
	LL-37 1:100	(+)
Tube, Epithel	hBD-1 1:100	0
	hBD-2 1:100	++
	LL-37 1:50	++
Cervix, Epithel	hBD-1 1:100	++
	hBD-2 1:100	++
	LL-37 1:100	++
Samenstrang, Epithel	hBD-1 1:100	0
	hBD-2 1:100	0
	LL-37 1:100	0
Samenstrang, Muskelschicht	hBD-1 1:100	+
	hBD-2 1:100	+
	LL-37 1:100	+



## Tabelle 5

Tabellenübersicht Mensch: Zusammenfassung der Ergebnisse der immunhistochemischen  
Untersuchung mit hBD-1, hBD-2 und LL-37 verschiedener Organe

Signal: kein Signal (0) – schwach (+) – mittel (++) – stark (+++) – sehr stark (++++)

Organ	Antikörper	Signal
Leber, Hepatozyten	hBD-1 1:100	0
	hBD-2 1:100	0
	LL-37 1:100	0
Milz, generell	hBD-1 1:100	0
	hBD-2 1:100	0
	LL-37 1:100	0
Knochenmark	hBD-1 1:100	0
	hBD-2 1:100	0
	LL-37 1:100	0
Haut, Schweißdrüsen, insbesondere die dunklen Zellen	hBD-1 1:500	++
	hBD-2 1:100	++
	LL-37 1:100	++
Epidermis	hBD-1 1:500	++
	hBD-2 1:100	++
	LL-37 1:100	++
Vena porta, Gefäßwand	hBD-1 1:100	0
	hBD-2 1:100	0
	LL-37 1:100	0
Plexus choroideus, Epithel	hBD-1 1:100	+
	hBD-2 1:100	++
	LL-37 1:100	++
Herz, Myokard	hBD-1 1:100	0

## Tabelle 6

Tabellenübersicht Mensch: Zusammenfassung der Ergebnisse der immunhistochemischen  
Untersuchung mit hBD-1, hBD-2 und LL-37 an der Niere

Signal: kein Signal (0) – schwach (+) – mittel (++) – stark (+++) – sehr stark (++++)

Organ	Antikörper	Signal
Niere, Podozyten der Glomeruli	hBD-1 1:100	+
	hBD-2 1:100	++
	LL-37 1:100	0
Niere, proximale Tubuli	hBD-1 1:500	(+)/+
	hBD-2 1:100	(+)/+
	LL-37 1:100	(+)/+
Niere, distale Tubuli	hBD-1 1:500	+ / ++
	hBD-2 1:100	+ / ++ / +++
	LL-37 1:100	++
Niere, Sammelrohre (speziell die Schaltzellen)	hBD-1 1:500	++
	hBD-2 1:100	++ / +++
	LL-37 1:100	++

## 5. Diskussion

Die wesentliche Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass die drei untersuchten antimikrobiellen Peptide in sehr vielen Organen des menschlichen Organismus weit verbreitet vorkommen, wobei die Expression in Epithelien im Vordergrund steht. Wichtig ist auch, dass diese Peptide bei Rhesusaffe und Mensch in weitgehend ähnlicher Verteilung zu finden sind. Die stärksten Färbungen bei den hier durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen zeigten sich in Geweben, die innere oder äußere Körperoberflächen auskleiden und eine Verbindung zur Körperoberfläche besitzen. Die Peptide werden in sekretorischen und nicht speziell sekretorischen Zellen meist maximal im apikalen Zellpol exprimiert, was darauf hinweist, dass die untersuchten Peptide zur Abwehr auf inneren und äußeren Körperoberflächen beitragen. Auffällig und überraschend ist, dass recht häufig glatte Muskelzellen positiv reagieren.

Die immunhistochemische Analyse eröffnet einen anderen Blick auf Lokalisation und Biologie antimikrobieller Peptide als die molekularbiologische Analyse der Genexpression. Das unterstreicht nochmals die Funktion der antimikrobiellen Peptide sowohl als direkte endogene Antibiotika als auch als Vermittlersubstanzen der angeborenen Immunität.

Die Daten der immunhistochemischen Analyse stehen nicht im Widerspruch zu bekannten Daten, denen Befunde zur Genexpression (mRNA-Spiegel) zugrunde liegen.

### **Lunge/Respirationstrakt:**

Zahlreiche Arbeiten haben sich in den letzten Jahren mit den antimikrobiellen Peptiden in den Atemwegen beschäftigt. Die Immunhistochemie konnte in der vorliegenden Untersuchung drei dieser Peptide nachweisen.

Insgesamt färbten sich bei den hier untersuchten Proben die proximaleren Teile der Atemwege intensiver als die distalen. Dies ist vermutlich mit der Nähe bzw. der Ferne von der äußeren Körperoberfläche und der Außenwelt des Organismus korreliert.

In den Epithelien der gasaustauschenden Region ergab sich nur ein sehr schwaches Signal, das z. T. recht eindeutig den Pneumozyten II zuzuordnen ist, die ja auch in anderer Hinsicht sekretorische Zellen sind. Die Alveolarmakrophagen exprimierten alle drei Antikörper kräftig positiv, was ihre Rolle in der angeborenen Abwehr unterstreicht.

HBD-1 und hBD-2 konnten in den untersuchten Pneumonielungen und Emphysemlungen besonders deutlich nachgewiesen werden, aber auch in gesunden Lungen gelang ihr Nachweis. Dies spricht dafür, dass das Ausmaß der Expression regulierbar ist

In vielen Präparaten der Atemwege waren Knorpelzellen und der Ziliensaum positiv. Diese zwei Lokalisationen sind schwer zu beurteilen, vermutlich handelt es sich aber um unspezifische Kreuzreaktionen (Knorpelzellen) oder um unspezifische Niederschläge an der Zelloberfläche (Zilien) bzw. an den Rändern der Knorpelzelllakunen. Auf alle Fälle wären gezielte spezielle Untersuchungen erforderlich, um die Validität dieser Befunde besser beurteilen zu können.

In Übereinstimmung mit obigen Ergebnissen wurden durch in-situ-Hybridisierung bereits in den Epithelien der Atemwege gesunder Lungen, von den proximalen Bronchien zu den distalen Bronchiolen, hohe Konzentrationen von hBD1-m-RNA gefunden (Singh et al., 1998). Auch im Epithel der Bronchialdrüsen konnte  $\beta$ -Defensin 1 auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden (Singh et al., 1998). Die hier durchgeführten immunhistochemischen Nachweise auf Proteinebene und die Ergebnisse der in-situ-Hybridisierung entsprechen einander.

Mit anderen Nachweismethoden wurde hBD-1 in bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit von gesunden Freiwilligen, CF-Patienten und Patienten mit entzündlichen Lungenerkrankungen gefunden, während hBD-2 in bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit von Patienten mit CF und entzündlichen Lungenerkrankungen gefunden wurde, jedoch nicht in gesunden Freiwilligen (Singh et al., 1998).

Wir untersuchten ausschließlich Gewebe erwachsener Menschen und Rhesusaffen für die schon exprimierten Proteine. Um zu prüfen, ob die hBD-1-mRNA-Expression in der Lunge vom Entwicklungsstadium abhängt, wurden in einer anderen Arbeit Gewebe aus fetalen, neonatalen und adulten Proben untersucht (McCray und Bentley, 1997). Die mRNA für hBD-1 ist in fetaler Lunge des 1. und 2. Trimenons nicht nachweisbar, was mit der Annahme eines Fehlens pränataler Expression übereinstimmt. Im Gegensatz dazu weisen neonatale und adulte Lunge hBD-1 mRNA auf (Mc Cray und Bentley, 1997).

Neugeborene Kaninchen weisen sogar einen Mangel an Defensinen in den Alveolarmakrophagen (MCP-1 und MCP-2) auf (Ganz et al., 1985).

Die Verteilung der hBD-2-Expression wurde außerdem in anderen Untersuchungen durch Dot-Blot-Hybridisierung bestimmt (Bals et al., 1998). Gehirn beispielsweise war negativ, die stärkste Expression fand sich in der Lunge. Auf der Ebene der fertigen Proteine,



wie sie immunhistochemisch hier nachgewiesen wurden, fanden sich entsprechende Ergebnisse.

Zudem wurde gegen hBD-2 ein Antiserum hergestellt und ein hochsensibler Radioimmunoassay (RIA) etabliert. Hochleistungs-Reverse-Phase-Flüssigkeitschromatographie gepaart mit RIA zeigte die Anwesenheit von hBD-2 in der menschlichen Lunge und in bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit sowie im Plasma (Harder et al., 1997), übereinstimmend mit den hier dargestellten immunhistochemischen Ergebnissen.

Auch durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurde die Expression von hBD-2 in der proximalen menschlichen Lunge untersucht. Ein diffuses Hybridisierungssignal auf die gegenläufige Probe wurde im gesamten Oberflächenepithel der Atemwege gefunden, ebenso in den Ausführungsgängen submuköser Drüsen. Die stärkste Expression von hBD-2 in den Bronchialdrüsen kommt in den serösen Endstücken vor, dokumentiert durch die Kolorisierung des in situ-Signals mit immunhistochemischem Nachweis des für seröse Zellen spezifischen Markerlysozyms (Bals et al., 1998). In den mukösen Tubuli war hBD-2-RNA auch nachweisbar, aber weniger stark (Bals et al., 1998). Die Expression von hBD-2 in der distalen Lunge konnte auf Grund der hohen Autofluoreszenz am besten durch Koppelung mit alkalischer Phosphatase nachgewiesen werden. Niedrigere, aber doch gut nachweisbare Mengen an hBD-2 findet man in den meisten Zellen der distalen Atemwege. Auch immunhistochemisch zeigte sich ein proximal-distaler Gradient.

Bei allen Antikörpern und allen Arten von Lunge in dieser Arbeit war das respiratorische Epithel positiv gefärbt, was als Hinweis auf Produktion und Sekretion der untersuchten Antikörper gewertet werden kann. Die positive Reaktion der Zilien selbst ist – wie schon angedeutet - vermutlich ein Artefakt oder beruht vielleicht darauf, dass positives Sekret an der Oberfläche der Zilien haftet oder dass sich hier unspezifisch Reaktionsprodukt ablagert wie am Spülsaum am Meer. Unterstützt wird die Annahme, dass es sich hier um ein Artefakt handelt, durch die Beobachtung, dass keineswegs alle Flimmerepithelien im Bereich des Kinozilienraumes eine positive Reaktion zeigen.

Zum Nachweis der Sekretion von hBD-2 auf die Oberfläche der Atemwege waren weitere interessante Studien durchgeführt worden. Menschliche, zur Transplantation ungeeignete Lungen von Spendern, wurden einer Lavage unterzogen und die Flüssigkeit wurde einer partiellen Reinigung von hBD-2 durch organische Extrahierung und reverse Phase HPLC (high performance liquid chromatography) unterzogen (Bals et al., 1998). Fraktionen mit antimikrobieller Aktivität wurden durch Gelelektrophorese und Westernblot weiter analysiert, wobei der für rekombinant hergestelltes hBD-2 spezifische Antikörper

verwendet wurde. Es wurde die Gegenwart immunreaktiver Peptide in den entsprechenden Fraktionen, die gemeinsam mit rekombinantem hBD-2 (41-Aminosäuren-Unterform) wandern, nachgewiesen. Verminderte, aber nachweisbare hBD-2-Konzentrationen wurden in der Oberflächenflüssigkeit humaner Xenotransplantate gesehen.

Nur die 41-Aminosäuren-Isoform von hBD-2 konnte in den Sekreten der Atemwege gefunden werden, die auch von Insektenzellen produzierte 38-Aminosäuren-Isoform konnte in den entsprechenden erwarteten Fraktionen nicht gefunden werden (Bals et al., 1998).

Wahrscheinlich stimulieren fremde Mikroorganismen und inflammatorische Zytokine die hBD-2-Biosynthese und die Freisetzung des Peptids in die Atemwege bei Infektionen des Respirationstraktes, was zu dem hier festgestellten vermehrten Proteinnachweis in erkrankten Lungen passt. Die Plasmakonzentration von hBD-2 in Patienten mit bakterieller Pneumonie betrug  $32,1 \pm 3,7$  fmol/ml, also das 3,9-fache derer normaler Individuen (Hiratsuka et al., 1998).

Immunhistochemisch war LL-37 beim Menschen in gesunden Lungen im Gegensatz zu Pneumonielungen etwas schwächer nachweisbar. Beim Menschen und beim Rhesusaffen zeigte sich eine Expression dieses Peptids im Flimmerepithel, in den serösen Drüsenzellen und etwas weniger stark in den Alveolarmakrophagen. Die große Ähnlichkeit hinsichtlich der Expression dieser Peptide überrascht letztlich nicht, weil sie eine fundamentale Abwehrfunktion besitzen. Die phylogenetische Eigenentwicklung von Mensch und Rhesusaffe besteht seit vielen Millionen Jahren, der letzte gemeinsame Vorfahr lebte vermutlich vor ca. 35 Millionen Jahren (Bauer und Schreiber, 1996).

RNA-Hybridisierungsexperimente zeigten ebenfalls die Expression von LL-37/hCAP-18 in Trachea und gesunder Lunge (Bals et al., 1998), was auch den Ergebnissen der Immunhistochemie entspricht.

Die Expression von LL-37/hCAP-18 in den Atemwegen kranker Lungen, nachgewiesen durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (Bals et al., 1998), ähnelt der von hBD-1, beide wurden in den Oberflächenepithelien der proximalen Atemwege und auch den Zellen der submukösen Drüsen gefunden. In den distalen Atemwegen trat LL-37/hCAP-18 im Vergleich zu hBD-1 vermindert auf.

Gewebe zahlreicher erkrankter menschlicher Lungen wurden durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung analysiert. Hybridisierung der gegenläufigen LL-37/hCAP-18-Probe mit Schnitten der oberen Luftwege zeigte eine einförmige Färbung im ganzen Epithel sowie von Anteilen der Bronchialdrüsen (Bals et al., 1998). Bei der immunhistochemischen

Untersuchung fand sich, dass einige Zellen stärker als andere angefärbt waren. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass manche Zellen die dort produzierten antimikrobiellen Peptide schneller als andere abgeben, oder dass die Einzelzellen ihr Sekret nicht synchronisiert speichern und sezernieren.

In der Trachea des Rhesusaffen und Menschen war das Signal für hBD-1 und LL-37 mittelstark, für hBD-2 ergab sich kein positives Signal.

RNA-Hybridisierungsexperimente zeigten die Exprimierung von LL-37/hCAP-18 auch in der Trachea (Bals et al., 1998), was den immunhistochemischen Ergebnissen zum Nachweis der fertigen Proteine entspricht.

### **Gastrointestinal-Trakt:**

Aus verschiedenen Untersuchungen, die vor allem mit biochemischer Methodik arbeiteten, ist schon bekannt, dass antimikrobielle Peptide auch im Gastrointestinaltrakt verbreitet vorkommen. Bedeutende Mengen an hBD-2-DNA fanden sich z.B. bei Dot-Blot-Hybridisierung unter anderem im Intestinaltrakt (Bals et al., 1998), was mit meinen immunhistochemischen Ergebnissen übereinstimmt.

### **Magen:**

In den untersuchten Gewebeproben des menschlichen Magens (Corpus/Fundus) ließen sich hBD-1, hBD-2 und LL-37 nachweisen. Dünndarm- und Colonpräparate reagierten bei den immunhistochemischen Untersuchungen ebenfalls mit allen drei Antikörpern –allerdings unterschiedlich stark- positiv.

LL-37/hCAP-18-RNA wurde in einer Untersuchung von Bals et al. (1998) verstreut im ganzen Epithel des Magens gefunden, Wah et al. (2006) vermuten, dass dieses Peptid auch in endokrinen Zellen der Magen- und Darmmukosa vorkommt.

Die Anfärbung bei den immunhistochemischen Untersuchungen war im Magen des Menschen nicht gleichmäßig. Bei der Mehrzahl der Proben färbte sich der basale Teil der Magendrüsen für hBD-1 stärker an als der restliche Teil der Drüsen. Hier sind es vor allem die Hauptzellen, die sich besonders intensiv anfärben. Die fertigen Peptide beim Menschen scheinen also vorwiegend in diesem Bereich gebildet zu werden. Die Neben- und Oberflächenepithelzellen färbten sich beim Menschen schwach bis mittelstark an. Im Magen des Rhesusaffen färbten sich mit hBD-2 auch die Belegzellen an. Möglicherweise produzieren

diese Zellen hier also nicht nur HCl und „Intrinsic Factor“, sondern auch antimikrobielle Peptide. Diese Möglichkeit verdient, in einer eigenen Untersuchung vertieft überprüft zu werden. Ansonsten stimmte das Färbemuster beim Rhesusaffen mit dem des Menschen überein.

### **Dünndarm:**

In den untersuchten menschlichen Dünndarmproben ließen sich hBD-1, hBD-2 und LL-37 nachweisen.

Auch durch in situ-Hybridisierung mit einer zu hBD-2 gegenläufigen Probe (Bals et al., 1998), welche mit Digoxigenin markiert war, und mit mit Alkalischer Phosphatase konjugierten Antikörpern sichtbar gemacht wurde, fand sich hBD-2-RNA in epithelialen Zellen im gesamten Dünndarm. Bei Mensch und Rhesusaffe wurde immunhistochemisch hBD-2 ebenfalls im gesamten GI-Trakt nachgewiesen. Die Ergebnisse auf RNA- und fertiger Proteinebene stimmen also überein.

Auch LL-37/hCAP-18-RNA wurde verstreut im ganzen Epithel des oberen Gastrointestinaltraktes, einschließlich des Magens und des Duodenums, gefunden (Bals et al., 1998). Wah et al. (2006) fanden LL-37-positive endokrine Zellen im Dünndarm, was auch beim Rhesusaffen der Fall ist (Abb. 7, Rhesusaffe).

Im menschlichen Dünndarm war die Signalintensität für alle drei Antikörper schwach bis stark, und das vor allem im apikalen Teil der Epithelzellen, aber in allen Bereichen der Zotten. Hier erfolgt also die hauptsächliche Sekretion innerhalb des Dünndarms, was auch biologisch sinnvoll erscheint.

### **Colon:**

In den untersuchten menschlichen Gewebeschnitten des Colons ließen sich hBD-1, hBD-2 und LL-37 nachweisen.

Auch durch in situ-Hybridisierung mit einer zu hBD-2 gegenläufigen Probe, welche mit Digoxigenin markiert war, und mit mit Alkalischer Phosphatase konjugierten Antikörpern sichtbar gemacht wurde, fand sich hBD-2-RNA in epithelialen Zellen im gesamten Colon. Bei Mensch und Rhesusaffe wurde immunhistochemisch hBD-2 ebenfalls im Colon nachgewiesen. Die Ergebnisse auf RNA- und fertiger Proteinebene stimmen also überein. Auch LL-37/hCAP-18-RNA wurde verstreut im ganzen Epithel des unteren



Gastrointestinaltrakts gefunden (Bals et al., 1998). Dies erinnert auch an Befunde von Wah et al. (2006), die LL-37 in endokrinen Zellen auch des Colons fanden

Immunhistochemisch konnte, abgesehen von der groben Übereinstimmung der Lokalisation auf RNA- und fertiger Proteinebene, eine genauere Lokalisationsbestimmung des fertigen Proteins vorgenommen werden.

Im menschlichen Colonepithel ergab sich bei den hier durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen für beide Verdünnungen aller Antikörper ein schwaches bis starkes positives Signal. Bei LL-37 war das positive Signal mehr im apikalen Bereich der Kryptenepithelzellen, bei hBD-2 mehr im basalen Bereich und bei hBD-1 war manchmal nur der apikale Teil, manchmal die ganze Zelle angefärbt, ohne Bevorzugung eines bestimmten Bereichs in den Krypten. Auch das Oberflächenepithel färbte sich an. In manchen Teilen fanden sich auch auf der Oberfläche des Epithels angefärbte Sekrete. Dies deutet auf die Sezernierung der fertigen Proteine in den Oberflächenschleim hin. Mitunter war das Oberflächenepithel stärker angefärbt als das Kryptenepithel. Die Heterogenität der Expressionsstärke lässt vermuten, dass u. U. eine Anpassung an die Last mit pathogenen Mikroorganismen möglich ist.

### **Becherzellen:**

Ein schwieriges Problem ist die Bewertung des Ausfalls der Immunhistochemie der drei untersuchten Peptide in den Becherzellen. Sorgfältige Auswertung lässt vermuten, dass die Becherzellen im Atemtrakt keine antimikrobiellen Peptide exprimieren (siehe z. B. Abb. 4 und 5, Mensch). Im Darmtrakt zeigten die Becherzellen auch oft keine positive Reaktion, aber speziell beim Rhesusaffen fiel die Reaktion variabel aus und viele Becherzellen wiesen im apikalen Schleim positiv reagierende Regionen auf. Es muss speziell untersucht werden, inwieweit positiver Reaktionsausfall in den Becherzellen ein real vorhandenes Resultat oder ein Artefakt ist.

### **Panethzellen:**

Panethzellen sind Epithelzellen mit Granula, die an der Basis der intestinalen Krypten liegen (Madara und Trier, 1987), und sie leiten sich von Stammzellen ab, die auch die Villus-Enterozyten (Cheng et al., 1969) hervorbringen. Im Gegensatz zu den kurzlebigen Enterozyten, die im Villus aufsteigen und innerhalb von drei bis fünf Tagen ins Lumen abgeschilfert werden, reifen Panethzellen unterhalb der Proliferationszone und haben eine

Lebenszeit von ca. 20 Tagen (Troughton und Trier, 1969). Panethzellen synthetisieren Proteine, die im allgemeinen als charakteristisch für Leukozyten erachtet werden, einschließlich Tumornekrosefaktor (TNF) (Keshav et al., 1990) und Lysozym (Speece, 1964). Tumornekrosefaktor ist ein pleiotropes Zytokin, das an einer Vielzahl verschiedener zellulärer Antworten beteiligt ist. Da Lysozym vermutlich unter cholinерger Stimulation ins Dünndarmlumen sezerniert wird (Peeters und Vantrappen, 1975), sezernieren diese Zellen eventuell zusätzliche antimikrobielle Faktoren, was die Bakterienbesiedlung und -invasion des Epithels durch pathogene Bakterien begrenzt (Selsted et al., 1992).

Immunhistochemische Lokalisation demonstrierte, dass Cryptidin-1, und wahrscheinlich Cryptidin -2 und -3, ausschließlich in Panethzellen vorkommen, wo diese Peptide mit den zytoplasmatischen Granula assoziiert zu sein scheinen (Selsted et al., 1992). Die menschlichen  $\beta$ -Defensine und LL-37 hingegen finden sich bei Nachweis durch Immunhistochemie aber nicht nur in den Panethzellen, sondern im gesamten Darmepithel. Bei unseren immunhistochemischen Untersuchungen zeigte sich eine Lokalisation der drei untersuchten antimikrobiellen Peptide bei Rhesusaffe und Mensch in den Panethschen Körnerzellen.

Cryptidin-mRNA wurde ebenfalls ausschließlich in Panethzellen des Dünndarms gefunden (Quellette et al., 1989). Cryptidin-mRNA ist eine von mehreren in hoher Zahl vorhandenen niedermolekularen mRNAs, die kleine, cysteinreiche Polypeptide kodieren, die sich im Dünndarm von Mäusen während der postnatalen Reifung ansammeln (Quellette und Lualdi, 1990). Mäusecryptidin-mRNA kodiert für ein 93 Aminosäuren langes Protein, das den abgeleiteten neutrophilen Defensinvorläufern von Menschen und Kaninchen ähnlich ist (Daher et al., 1988). Das Cryptidingen Defcr in der proximalen Region von Chromosom 8 zeigt eine erhaltene Verbindungshomologie mit den menschlichen Defensingenen auf 8p23 (Sparkes et al., 1989).

Es wurde spekuliert, dass Panethzellen Defensine in den Raum zwischen den Zotten sezernieren, wo sie eventuell zur Errichtung eines lokal antibakteriellen Milieus beitragen. Dies würde mit der Fähigkeit von Panethzellen übereinstimmen, Lysozym als Antwort auf cholinerge Agenzien zu sezernieren (Peeters und Vantrappen, 1975; Satoh et al., 1989). Die immunhistochemische Reaktion der Defensine fiel beim Rhesusaffen deutlich stärker aus als beim Menschen. Ob dies ein konstanter Unterschied ist, oder ob es sich um zufällig angetroffene etwas verschiedene Funktionsphasen handelt, bleibt vorläufig unklar.

### **Pankreas:**

Die sekretorischen Azini des Pankreas färbten sich bei unseren immunhistochemischen Untersuchungen beim Rhesusaffen und beim Menschen für alle drei Peptide, zwar schwach, aber immer positiv an. Das im Allgemeinen insgesamt schwache Signal konnte aber hinsichtlich seiner Expressionsstärke variieren. Auch durch in situ-Hybridisierung mit einer zu hBD-2 gegenläufigen Probe, welche mit Digoxigenin markiert war, und mit mit Alkalischer Phosphatase konjugierten Antikörpern sichtbar gemacht wurde, fand sich hBD-2-RNA diffus verteilt in den Azinuszellen des Pankreas. Sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene zeigte sich also eine schwache und variable Verteilung im Pankreas, was an unterschiedlichen funktionellen Phasen der Drüsenepithelzellen liegen könnte. Die Ergebnisse auf RNA- und fertiger Proteinebene stimmen also überein. Auch LL-37/hCAP-18-RNA wurde im Drüsenepithel des Pankreas gefunden (Bals et al., 1998).

### **Niere:**

In der Niere des Rhesusaffen färbten die Antikörper gegen alle drei antimikrobiellen Peptide vor allem die distalen Tubuli und Sammelrohre, deutlich schwächer reagierten im Allgemeinen die proximalen Tubuli. Selten reagierte aber auch das Epithel der proximalen Tubuli mittelstark. Für hBD-2 und LL-37 ergab sich auch eine z. T. intensive Anfärbung von Material im Lumen der Sammelrohre. Dies kann als Hinweis auf eine Sekretion dieser antimikrobiellen Peptide gewertet werden.

In der menschlichen Niere färbten sich die Sammelrohre, die proximalen und die distalen Tubuli für alle drei Antikörper an. Die Färbungsintensität war in den distalen Tubuli und den Sammelrohren am stärksten, alle Zellen eines Tubulus färbten sich gleichmäßig an. In einigen Lumina der Sammelrohre gab es ein intensives positives Signal, am stärksten für LL-37. Sorgfältige Analyse der Sammelrohre frisch fixierten Materials zeigte, dass sich einzelne Zellen besonders stark anfärbten (siehe z. B. Abb. 38, 39, 40, Mensch). Nach morphologischen Kriterien handelt es sich hierbei um die Schaltzellen. Dieser Befund verdient eine spezielle Nachuntersuchung und würde das Funktionsspektrum der Schaltzellen erweitern.

Durch Northern-Blot-Analyse wurde in der Niere sowohl für Menschen- als auch Mäusegene die höchste Konzentration an  $\beta$ -Defensin-mRNA gefunden (Ganz und Lehrer, 1994). Auch bei späteren Untersuchungen wurde durch Northernblotting die höchste

Konzentration von hBD-1-mRNA in der Niere und dem weiblichen Reproduktionstrakt gefunden (Valore et al., 1998).

Durch in-situ-Hybridisierung wurde hBD-1-mRNA ebenfalls in den Epithelien der Henleschen Schleife, der distalen Tubuli und der Sammelrohre lokalisiert (Valore et al., 1998).

Unter Verwendung einer neuen Technik, die entwickelt wurde, um kationische Peptide im Urin auffindig zu machen, wurden einige Formen von hBD-1 entdeckt, die in ihrer Länge von 36 bis 47 Aminosäuren variierten (Valore et al., 1998). Die Gesamtkonzentration von hBD-1-Formen im Urin wurde auf 10-100 µg/l geschätzt, mit individuellen Unterschieden in der Gesamtmenge an hBD-1 und dem relativen Anteil an hBD-1.

Durch Westernblot wurde die Peptidkonzentration im Urin auf 10-100 µg/l geschätzt, und die relativen Mengen der verschiedenen hBD-1-Formen zeigten deutliche interindividuelle Unterschiede. Trotz der Anwesenheit multipler Proteinbanden enthielt Urin von Männern nur ein vorherrschendes hBD-1-Peptid, während Urin von Frauen meist zwei vorherrschende Banden enthielt. Auszüge von Nierengewebe erbrachten ähnliche hBD-1-Konzentrationen wie Urin (etwa 50 ng/g), ohne bedeutsame Unterschiede zwischen Kortex- und Markproben. Westernblot zeigte, dass multiple Formen von hBD-1 im Nierengewebe vorhanden sind (Valore et al., 1998).

Eine Hybridisierung mit der gegenläufigen Probe wurde für LL-37/hCAP-18-RNA im Sammelrohrsystem der Niere beobachtet (Bals et al., 1998).

Interessant ist, dass in der vorliegenden Arbeit offenbar erstmalig beobachtet werden konnte, dass die Podozyten der Nierenglomeruli die zwei Defensine exprimieren. Eine Abwehrfunktion an der wichtigen Blut-Harnschanke ist biologisch sehr sinnvoll (Glomerulonephritiden).

### **Ableitende Harnwege:**

Die Epithelien der ableitenden Harnwege exprimieren die antimikrobiellen Peptide im Allgemeinen mittelstark. Diese Reaktion steht in Einklang mit den anderen Beobachtungen, die zeigen, dass die Epithelien von Hohlorganen, die mit der Außenwelt kommunizieren, kräftige angeborene Abwehrmechanismen besitzen.



### **Geschlechtsorgane (einschließlich Mamma):**

Das Epithel der nichtlaktierenden Brustdrüse färbte sich bei Mensch und Rhesusaffe für alle drei untersuchten Peptide an. Sogar die myoepithelialen Zellen der menschlichen weiblichen Brust färbten sich für hBD-1 und hBD-2 stark an, was darauf hindeutet, dass offenbar auch diese Zellen sekretorisch aktiv sind. Bei LL-37 zeigte sich keinerlei positives Signal. Ausgewählte Gewebeproben wurden durch in situ-Hybridisierung mit einer zu hBD-2 gegenläufigen Probe, welche mit Digoxigenin markiert war, analysiert und mit mit Alkalischer Phosphatase konjugierten Antikörpern sichtbar gemacht (Bals et al., 1998). Auch in den Gängen der weiblichen Brust war ein diffuses Signal vorhanden. Die höhere Sensitivität der in situ-Hybridisierung machte die Expression von hBD-2 in menschlicher Brust klar erkennbar, während bei der Dot-Blot-Hybridisierung das Signal gering war (Bals et al., 1998).

Die Drüsen des Corpus uteri waren beim Rhesusaffen für hBD-1, hBD-2 und LL-37 positiv bei den hier durchgeführten Untersuchungen.

In der menschlichen Cervix waren die Drüsenzellen kräftig positiv, wobei einige wenige ein besonders intensives Signal zeigten. Bei LL-37 fand sich ein kleiner Bereich im apikalen Teil fast aller Drüsenzellen, der stärker angefärbt war als der basale Zellteil, was auf eine zeitweise granuläre Speicherung in diesem Bereich hinweist.

Durch in-situ-Hybridisierung wurde hBD-1-mRNA in der Ektocervix, der Endocervix sowie dem Uterus des weiblichen Reproduktionstraktes des Menschen lokalisiert (Valore et al., 1998). Auf Proteinebene jedoch war bei meinen Untersuchungen hBD-1 hier nicht nachweisbar, was u. U. auf sehr schnelle Abgabe des fertigen Proteins und geringere Sensitivität der Immunhistochemie hindeuten könnte.

In den Follikelepithelzellen der Eierstöcke des Menschen waren alle drei Antikörper exprimiert. Durch in-situ-Hybridisierung wurde hBD-1-mRNA in den Epithelschichten der Vagina und der Eierstöcke des weiblichen Reproduktionstraktes lokalisiert (Valore et al., 1998).

Im männlichen Reproduktionssystem des Rhesusaffen waren die Defensine in Einzelzellen in den Samenkanälchen, höchstwahrscheinlich den Sertolizellen, exprimiert.

Im menschlichen Samenstrang färbten sich die glatten Muskelzellen des Plexus pampiniformis stärker als der Rest. Die Verteilung der hBD-2-Expression wurde in schon erwähnten anderen Untersuchungen durch Dot-Blot-Hybridisierung bestimmt. Bedeutende Mengen an DNA fanden sich unter anderem im Urogenitaltrakt (Bals et al., 1998).

Die positive Reaktion in den glatten Muskelzellen dieses und anderer Organe ist noch nicht mit hinreichender Sicherheit interpretierbar. LL-37 hat wahrscheinlich auch angiogenetische Funktion (Koczulla et al., 2003). Möglicherweise haben die in glatter Muskulatur gebildeten Peptide auch einen Einfluss auf den Blutdruck, nicht auszuschließen ist letztlich auch, dass eine unspezifische Kreuzreaktion vorliegt.

### **Epidermis:**

Bei den hier bearbeiteten Hautproben des Menschen färbten sich die Zellen der Epidermis stark an. Innerhalb der Schweißdrüsen färbten sich vor allem die dunklen Zellen an. Die dunklen Zellen sind sekretorisch aktive Zellen. Auch die Duftdrüsen färbten sich an. Die „Glomeruli“, Strukturen, in denen sich Arteriolen und Venolen verbinden, waren ebenfalls positiv.

Bei der in situ-Hybridisierung mit einer zu hBD-2 gegenläufigen Probe, welche mit Digoxigenin markiert war und mit mit Alkalischer Phosphatase konjugierten Antikörpern sichtbar gemacht wurde, fand sich auch in der Epidermis die entsprechende RNA. Dort war in den Epithelzellen ein diffuses Signal vorhanden. In Übereinstimmung mit aus in-situ-Hybridisierung gewonnenen Daten zeigte die Immunhistochemie auch in früheren Untersuchungen starke Färbung für das hBD-2-Peptid in epidermalen Keratinozyten bei Psoriasis und entzündeter Haut (Liu et al., 1998). Die höchste Konzentration an hBD-2 wurde fokal in entzündeten Epidermiszellen festgestellt (Liu et al., 1998). Diese Daten zeigen, dass hBD-2 fokal in Hautkeratinozyten in Verbindung mit Entzündung induziert wird (Liu et al., 1998).

HBD-2 wurde ebenfalls aus psoriatischen Schuppenextrakten von Patienten mit Psoriasis unter Verwendung einer gesamten E.coli Affinitätssäule, welche kationische antimikrobielle Peptide bindet, isoliert (Harder et al., 1997). HBD-2-mRNA war deutlich erhöht in Epidermis, welche entzündete Regionen umgibt, jedoch in angrenzenden nicht entzündeten Gebieten nicht nachweisbar, eine Verteilung, die auf Peptidniveau durch Immunfärbung mit hBD-2-Antikörpern bestätigt wird. Bei den jetzigen immunhistochemischen Untersuchungen konnte hBD-2 jedoch auch in nicht entzündeten Hautanteilen nachgewiesen werden. Dieser Widerspruch muss in zukünftigen Untersuchungen aufgeklärt werden.

Es wurde gezeigt, dass die hBD-2-Genexpression in Keratinozyten durch Stimulierung mit grampositiven und gramnegativen Bakterien, *C. albicans* und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  deutlich aufreguliert wird (Harder et al., 1997).

Techniken der in situ-Hybridisierung und Immunzytochemie wiesen auch LL-37/hCAP-18 in entzündeten menschlichen Epidermiszellen nach (Frohm et al., 1997). Durch die hier durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen konnte LL-37 auch in den Schweißdrüsen nicht entzündeter Haut nachgewiesen werden.

### **Andere Organe:**

Bedeutende Mengen an DNA für hBD-2 fanden sich durch Dot-Blot-Hybridisierung in Leukozyten, im Thymus und in den hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks (Bals et al., 1998). Wah und Kollegen fanden in Lymphozyten und Makrophagen des Darm- und Atemtraktes mit immunhistochemischer Methodik hBD-1, hBD-2 und LL-37 (Wah et al., 2006). Wahrscheinlich aufgrund technischer Schwierigkeiten gelang in der Untersuchung dieser Arbeit kein Nachweis von Defensinen oder Cathelicidin im Knochenmark.

Für alle drei Antikörper war der Plexus choroideus hier leicht bis mittelstark positiv. Die mitangeschnittenen Hirnregionen waren negativ. Auch mit der Dot-Blot-Hybridisierungsmethode für hBD-2 hatte sich kein Peptidnachweis im Gehirn selber ergeben.

Für Herz und Milz des Affen ergab sich keinerlei spezifisches positives Signal, ebenso wenig für Leber, Portalvene und Milz des Menschen. Die Expression von  $\beta$ -Defensin 1 durch RET-PCR wurde jedoch auch im Herzen nachgewiesen. Möglicherweise wird das fertige Peptid nur in geringer Menge gebildet und dann sofort abgegeben und kann so in seiner fertigen Form nicht mehr nachgewiesen werden.

Die Gesamtheit der oben ausgeführten Ergebnisse deutet darauf hin, dass  $\beta$ -Defensin 1 und 2 sowie Cathelicidin als Vertreter der Gruppe der antimikrobiellen Peptide vor allem der antimikrobiellen Abwehr an Körperoberflächen dienen. Dementsprechend zeigten sich die stärksten Färbungen bei den hier durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen in Geweben, die innere oder äußere Körperoberflächen auskleiden sowie in sekretorischen Zellen.

## 6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit gelang der Nachweis der Peptide  $\beta$ -Defensin 1 und 2 sowie Cathelicidin LL-37 in einer Vielzahl von Organen, speziell in deren Epithelien. Diese Nachweise stehen in weitgehender Übereinstimmung mit den zuvor durch andere Untersuchungsmethoden in der Literatur beschriebenen Vorkommensorten von  $\beta$ -Defensin 1 und 2 sowie Cathelicidin.

Erwartungsgemäß lassen sich die antimikrobiellen Peptide hauptsächlich in den Epithelien von Organen finden, die mit der Außenwelt kommunizieren (Gastrointestinaltrakt, Lunge, Urogenitaltrakt) oder die die äußere Körperoberfläche bedecken (Epidermis). Dies entspricht ihrer bekannten Funktion bei der bakteriellen Abwehr.

Unterschiede der Expression auf Peptid- und RNA-Ebene lassen sich vor allem durch unterschiedliche Sensitivität der Methoden und durch die Sekretion dieser Peptide erklären, die nicht nur in Zellen vorkommen, sondern auch in Sekreten, die sich auf den Körperoberflächen finden.

Die beschriebenen Ergebnisse zeigen außerdem, dass die Vorkommensorte der antimikrobiellen Peptide des Rhesusaffen denen des Menschen stark ähneln. Daher könnten Rhesusaffen dazu dienen, als aussagekräftige Tiermodelle zur Untersuchung des angeborenen Abwehrsystems in Gesunden und Kranken eingesetzt zu werden, um damit Einschränkungen, die sich aus dem Einsatz von Mäusen als Tiermodellen bei der Untersuchung menschlicher Krankheiten ergeben, überwinden zu können.



## 7. Literatur

1. Agerberth B, Gunne H, Odeberg J, Kogner P, Boman HG, Gudmundsson HG. FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone-marrow and testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 195-199, 1995.
2. Ambruso DR, Sasada M, Nishiyama H, Kubo A, Komiyama A, Allen RH. Defective bactericidal activity and absence of specific granules in neutrophils from a patient with recurrent bacterial infections. *J. Clin. Immunol.* 4: 23-30, 1984.
3. Bals R, Wang X, Wu Z, Freeman T, Bafna V, Zasloff M, Wilson JM. Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J. Clin. Investig.* 102: 874-80, 1998.
4. Bals R, Wang X, Zasloff M, Wilson JM. The peptide antibiotic LL-37/ hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (16): 9541-6, 1998.
5. Bauer K, Schreiber A. Primate Phylogeny from a human perspective. G. Fischer Verlag, Stuttgart 1996.
6. Bensch KW, Raida M, Magert HJ, Schulz-Knappe P, Forssmann WG. HBD1 : a novel  $\beta$ -defensin from human plasma. *FEBS Lett.* 368 (2): 331-335, 1995.
7. Borregaard N, Kjeldsen L, Sengeløv H. Mobilization of granules in neutrophils from patients with myeloproliferative disorders. *Eur. J. Haematol.* 50 (4): 189-199, 1993.
8. Boxer LA, Coates TD, Haak RA, Wolach JB, Hoffstein S, Baehner RL. Lactoferrin deficiency associated with altered granulocyte function. *N. Engl. J. Med.* 307 (7): 404-410, 1982.
9. Breton Gorius J, Mason DY, Buriot D, Vilde JL, Griscelli C. Lactoferrin deficiency as a consequence of a lack of specific granules in neutrophils from a patient with recurrent infections. Detection by immunoperoxidase staining for lactoferrin and cytochemical electron microscopy. *Am J. Pathol.* 99: 413-428, 1980.
10. Cheng H, Merzel J, Leblond CP. Renewal of Paneth cells in the small intestine of the mouse. *Am J. Anat.* 126 (4): 507-525, 1969.
11. Chertov O, Yang D, Howard OM, Oppenheim JJ. Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses. *Immunological Reviews* 177: 68-78, 2000.
12. Daher KA, Lehrer RI, Ganz T, Kronenberg M. Isolation and characterization of human defensin cDNA clones. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85 (19): 7327-7331, 1988.

13. Daher KA, Selsted ME, Lehrer RI. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *J Virol* 60 (3): 1068-1074, 1986.
14. Diamond G, Zasloff M, Eck H, Brasseur M, Maloy WL, Bevins CL. Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (9): 3952-3956, 1991.
15. Eisenhauer PB, Harwig SS, Lehrer RI. Cryptidins: Antimicrobial defensins of the murine small intestine. *Infect. Immun.* 60 (9): 3556-3565, 1992.
16. Elssner A, Duncan M, Gavrilin M, Wewers MD. A Novel P2X7 Receptor Activator, the Human Cathelicidin-Derived peptide LL-37, Induces IL-1 $\beta$  Processing and Release. *The Journal of Immunology* 172 (8): 4987-4994, 2004.
17. Falla TJ, Karunaratne DN, Hancock RE. Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. *J. Biol. Chem.* 271 (32): 19298-19303, 1996.
18. Frohm M, Agerberth B, Ahangari G, Liden S, Stahle-Bäckdahl M, Gudmundsson GH. The expression of the human cathelin gene FALL 39 is induced in keratinocytes during inflammation. *Keystone Symp. J.* 2: 36, 1997 (abstr.).
19. Gallin JI, Fletcher MP, Seligmann BE, Hoffstein S, Cehrs K, Mounessa N. Human neutrophil-specific granule deficiency: a model to assess the role of neutrophil-specific granules in the evolution of the inflammatory response. *Blood* 59 (6): 1317-1329, 1982.
20. Gallo RL, Ono M, Povsic T, Page C, Eriksson E, Klagsbrun M, Bernfield M. Syndecans, cell surface heparan sulfate proteoglycans, are induced by a proline-rich antimicrobial peptide from wounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11035-11039, 1994.
21. Ganz T. Extracellular release of antimicrobial defensins by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* 55 (3): 586-571, 1987.
22. Ganz T, Lehrer RI. Defensins. *Curr. Opin. Immunology* 6: 584-589, 1994.
23. Ganz T, Lehrer RI. Defensins. *Pharmacol. Ther.* 66 (2): 191-205, 1995.
24. Ganz T, Metcalf JA, Gallin JI, Boxer LA, Lehrer RI. Microbicidal/cytotoxic proteins of neutrophils are deficient in two disorders: Chediak-Higashi syndrome and "specific" granule deficiency. *J. Clin. Invest.* 82 (2): 552-556, 1988.
25. Ganz T, Sherman MP, Selsted ME, Lehrer RI. Newborn rabbit alveolar macrophages are deficient in two microbicidal cationic peptides, MCP-1 and MCP-2. *Am. Rev. Respir. Dis.* 132 (4): 901-904, 1985.
26. Gough M, Hancock RE, Kelly NM. Antiendotoxin Activity of cationic peptide antimicrobial agents. *Infect. Immun.* 64 (12): 4922-4927, 1996.

27. Gudmundsson GH, Agerberth B, Odeberg J, Bergman T, Olsson B, Salcedo R. The human gene FALL 39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *Eur. J. Biochem.* 238 (2): 325-332, 1996.
28. Hancock RE. Peptide antibiotics. *Lancet* 349 (9049): 418-422, 1997.
29. Hancock RE., Falla T, Brown M. Cationic bactericidal peptides. *Adv. Microbial Physiol.* 37: 135-75, 1995.
30. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 387 (6636): 861, 1997.
31. Harwig SS, Swiderek KM, Kokryakov VN, Tan L, Lee TD, Panyutich EA, Aleshina GM, Shamova OV, Lehrer RI. Gallinacins: cysteine-rich antimicrobial peptides of chicken leukocytes. *FEBS Lett.* 342 (3): 281-285, 1994.
32. Higazi A, Lavi E, Bdeir K, Ulrich AM, Jamieson DG, Rader DJ, Usher DC, Kane W, Ganz T, Cines DB. Defensin Stimulates the Binding of Lipoprotein (a) to Human Vascular Endothelial and Smooth Muscle cells. *Blood* 89 (12): 4290-4298, 1997.
33. Hiratsuka T, Nakazato M, Date Y, Ashitani J, Minematsu T, Chino N, Matsukura S. Identification of Human  $\beta$ -Defensin-2 in Respiratory Tract and Plasma and Its Increase in Bacterial Pneumonia. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 249 (3): 943-947, 1998.
34. Huttner KM, Selsted ME, Quellerie AJ. Structure and diversity of the murine cryptdin gene family. *Genomics* 19 (3): 448-453, 1994.
35. Johansson J, Gudmundsson GH, Rottenberg ME, Berndt KD, Agerberth B. Conformation-dependent Antibacterial Activity of the naturally Occurring Human Peptide LL-37. *The Journal of biological chemistry* 273 (6): 3718-3724, 1998.
36. Johnston JJ, Boxer LA, Berliner N. Correlation of messenger RNA levels with protein defects in specific granule deficiency. *Blood* 80 (8): 2088-2091, 1992
37. Jones DE, Bevins CL. Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *J. Biol. Chem.* 267 (32): 23216-23225, 1992.
38. Jones DE, Bevins CL. Defensin 6-mRNA in human Paneth cells: Implications for antimicrobial peptides in host defense of the human bowel. *FEBS Lett.* 315 (2): 187-192, 1993.
39. Kagan BL, Selsted ME, Ganz T, Lehrer RI. Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1): 210-214, 1990.

40. Keshav S, Lawson L, Chung LP, Stein M, Perry VH, Gordon S. Tumor necrosis factor mRNA localized to Paneth cells of normal murine intestinal epithelium by in situ hybridization. *J. Exp. Med.* 171 (1): 327-332, 1990.
41. Koczulla R, von Degenfeld G, Kupatt C, Krötz F, Zahler S, Gloe T, Issbrücker K, Unterberger P, Zaiou M, Lebherz C, Karl A, Raake P, Pfosser A, Boekstegers P, Welsch U, Hiemstra PS, Vogelmeier C, Gallo RL, Clauss M, Bals R. An Angiogenic Role for the Human Peptide Antibiotic LL-37/hCAP-18. *J. Clin. Invest.* 111: 1665-1672, 2003.
42. Kogan BL, Ganz T, Lehrer RI. Defensins: a family of antimicrobial and cytotoxic peptides. *Toxicology* 87: 131-149, 1994.
43. Kolter R, Moreno F. Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* 46: 141-163, 1992.
44. Larrick JW, Hirata M, Balint RF, Lee J, Zhong J, Wright SC. Human CAP 18: A Novel Antimicrobial Lipopolysaccharide-Binding Protein. *Infect. Immun.* 63 (4):1291-1297, 1995.
45. Lehrer RI, Bevins CL, Ganz T. *In Mucosal Immunology*, 2<sup>nd</sup> edn. Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober WM jr. Bienenstock J, Hrsg. Academic press, New York, 1998.
46. Lehrer RI, Daher K, Ganz T, Selsted ME. Direct inactivation of viruses by MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics from rabbit leukocytes. *J. Virol.* 54 (2): 467-472, 1985.
47. Linzmeier R, Michaelson D, Liu L, Ganz T. The structure of neutrophil defensin genes. *FEBS Lett.* 321 (2-3): 267-273, 1993.
48. Liu L, Wang L, Jia HP, Zhao C, Heng HHQ, Schutte BC, McCray PB jr., Ganz T. Structure and mapping of the human  $\beta$ -Defensin hBD-2-gene and its expression at sites of inflammation. *Gene* 222 (2): 237-244, 1998.
49. Liu L, Zhao C, Heng HH, Ganz T. The human beta-defensin 1 and alpha-defensins are encoded by adjacent genes: Two peptide families with differing disulfide topology share a common ancestry. *Genomics* 43 (3): 316-320, 1997.
50. Madara JL, Trier JS. Functional morphology of the mucosa of the small intestine. *In Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Vol.2. Johnson LR, Hrsg. Raven Press, New York. 1209-1250, 1987.
51. Marder VJ, Feinstein DI, Francis CW, Colman RW. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. Colman RW, Hirsch J, Marder VJ, Salzman EW, Hrsg. JB Lippincott Co., Philadelphia. 1023-1063, 1994.
52. Martin E, Ganz T, Lehrer RI. Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates. *J. Leukoc. Biol.* 58 (2): 128-136, 1995.



53. McCray PB, Bentley L. Human Airway Epithelia Express a  $\beta$ -Defensin. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 16 (3): 343-49, 1997.
54. Nagaoka I, Yomogida S, Nakamura S, Someya A, Iwabuchi K, Yamashita T. Evaluation of the expression of the cationic peptide gene in various types of leukocytes. *FEBS Lett.* 302 (3): 279-283, 1992.
55. Nakazato M, Shiomi K, Date Y, Matsukura S, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H. Isolation and sequence determination of 6-and 8-kDa precursors of human neutrophil peptides from bone marrow, plasma and peripheral blood neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211 (3): 1053-62, 1995.
56. Ostergaard GZ, Tommerup N. The 8p-Syndrome. *Annu. Genet.* 32 (2): 87-91, 1989.
57. Ouellette AJ, Greco RM, James M, Frederick D, Naftilan J, Fallon JT. Developmental regulation of cryptdin, a corticostatin/defensin precursor mRNA in a mouse small intestinal crypt epithelium. *J. Cell Biol.* 108 (5): 1687-1695, 1989.
58. Ouellette AJ, Lualdi JC. A novel mouse gene family coding for cationic, cysteine-rich peptides. Regulation in small intestine and cells of myeloid origin. *J. Biol. Chem.* 265 (17): 9831-9837, 1990.
59. Palfree RG, Sadro LC, Solomon S. The gene encoding the human corticostatin HP-4 precursor contains a recent 86-base duplication and is located on chromosome 8. *Mol. Endocrinol.* 7 (2): 199-205, 1993.
60. Panyutich AV, Panyutich EA, Krapivin VA, Baturevich EA, Ganz T. Plasma defensin concentrations are elevated in patients with septicemia or bacterial meningitis. *J. Lab. Clin. Med.* 122 (2): 202-207, 1993.
61. Peeters T, Vantrappen G. The Paneth cell: a source of intestinal lysozyme. *Gut* 16 (7): 553-558, 1975.
62. Piers KL, Brown MH, Hancock RE. Improvement of outer membrane-permeabilization and lipopolysaccharide-binding activities of an antimicrobial cationic peptide by C-terminal modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38 (10): 2311-11, 1994.
63. Qu XD, Lloyd KC, Walsh JH, Lehrer RI. Secretion of type II phospholipase A2 and cryptdin by rat small intestinal Paneth cells. *Infect. Immun.* 64 (12): 5161-5165, 1996.
64. Ritonja A, Kopitar M, Jerala R, Turk V. Primary structure of a new cysteine proteinase inhibitor from pig leukocytes. *FEBS Lett.* 255 (2): 211-214, 1989.
65. Satoh Y. Effect of live and heat-killed bacteria on the secretory activity of Paneth cells in germ-free mice. *Cell Tissue Res.* 251 (1): 87-93, 1988.

66. Satoh Y, Ishikawa K, Oomori Y, Takede S, Ono K. Bethanechol and a G-Protein activator, NaF/AlCl<sub>3</sub>, induce secretory response in Paneth cells of mouse intestine. *Cell Tissue Res.* 269 (2): 213-220, 1992.
67. Satoh Y, Ishikawa K, Oomori Y, Yamano M, Ono K. Effects of cholecystokinin and carbamylcholine on Paneth cell secretion in mice: A comparison with pancreatic acinar cells. *Anat. Rec.* 225 (2): 124-132, 1989.
68. Scocchi M, Skerlavaj B, Romeo D, Gennaro R. Proteolytic cleavage by neutrophil elastase converts inactive storage proforms to antibacterial battenecins. *Eur. J. Biochem.* 209 (2): 589-595, 1992.
69. Segal GP, Lehrer RI, Selsted ME. In vitro effect of phagocyte cationic peptides on *Coccidioides immitis*. *J. Infect. Dis.* 151 (5): 890-94, 1985.
70. Selsted ME, Miller SI, Henschen AH, Ouellette AJ. Enteric defensins: antibiotic peptide components of intestinal host defense. *J. Cell Biol.* 118 (4): 929-936, 1992.
71. Selsted ME, Szklarek D, Lehrer RI. Purification and antibacterial activity of antimicrobial peptides of rabbit granulocytes. *Infect. Immun.* 45 (1): 150-154, 1984.
72. Selsted ME, Tang YQ, Morris WL, Mc Guire PA, Novotny MJ, Smith W, Henschen AH, Cullor JS. Purification, primary structures and antibacterial activities of beta-defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. *J. Biol. Chem.* 268 (9): 6641-6648, 1993.
73. Shi RJ, Simpson-Haidaris PJ, Lerner NB, Marder VJ, Silverman DJ, Sporn LA. Transcriptional regulation of endothelial cell tissue factor expression during *Rickettsia rickettsii* infection: involvement of the transcription factor NF-kappaB. *Infect. Immun.* 66 (3): 1070-1075, 1998.
74. Shiomi K, Nakazato M, Ihi T, Kangawa K, Matsuo H, Matsukura S. Establishment of radioimmunoassay for human neutrophil peptides and their increases in plasma and neutrophil infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195 (3): 1336-1344, 1993.
75. Singh PK, Jia HP, Wiles K, Hesselberth J, Liu L, Conway BA, Greenberg EP, Valore EV, Welsh MJ, Ganz T, Tack BF, McCray PB Jr. Production of  $\beta$ -defensins by human airway epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (25): 14961-14966, 1998.
76. Sparkes RS, Kronenberg M, Heinzmann C, Daher KA, Klisak I, Ganz T, Mohandas T. Assignment of defensin gene(s) to human chromosome 8p23. *Genomics* 5 (2): 240-244, 1989.
77. Speece AJ. Histochemical distribution of lysozyme activity in organs of normal mice and radiation chimeras. *J. Histochem. Cytochem.* 12: 384-391, 1964.

78. Troughton WD, Trier JS. Paneth cell and goblet cell renewal in mouse duodenal crypts. *J. Cell Biol.* 41 (1): 251-268, 1969.
79. Turner J, Cho Y, Dinh NN, Waring AJ, Lehrer RI. Activities of LL-37, a Cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antimicrob Agents Chemother.* 42 (9): 2206-2214, 1998.
80. Valore EV, Park CH, Quayle AJ, Wiles KR, McCrayX PB Jr., Ganz T. Human  $\beta$ -Defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J.Clin. Invest.* 101 (8): 1633-1642, 1998.
81. Wah J, Wellek A, Frankenberger M, Unterberger P, Welsch U, Bals R. Antimicrobial peptides are present in immune and host defense cells of the human respiratory and gastrointestinal tracts. *Cell Tissue Res.* 324 (3): 449-456, 2006.
82. Wang Y, Agerberth B, Löthgren A, Almstedt A, Johansson J. Apolipoprotein A-I binds and inhibits the Human Antibacterial/Cytotoxic Peptide LL-37. *The Journal of Biological Chemistry* 273 (50): 33115-118, 1998.
83. Zanetti M, Gennaro R, Romeo D. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett.* 374 (1): 1-5, 1995.
84. Zimmermann GR, Legault P, Selsted ME, Pardi A. Solution structure of bovine neutrophil beta-defensin-12: The peptide fold of the beta-defensins is identical to that of the classical defensins. *Biochemistry* 34 (41): 13663-13671, 1995.

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. F. J. Kaup, Deutsches Primatenzentrum Göttingen, danke ich für die großzügige Überlassung von gut fixiertem Material von erwachsenen Rhesusaffen. Das Material fiel im Rahmen von genehmigten Versuchen anderer wissenschaftlicher Projekte an.

Ebenso bedanken darf ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. F. W. Schildberg, dem ehemaligen Direktor der chirurgischen Universitätsklinik Großhadern, für sein Interesse am Thema der Arbeit und für die bereitwillige Überlassung von Operationsmaterial für diese Untersuchung.

Sehr dankbar bin ich zudem Frau Sabine Tost, Lehrstuhl II der Anatomischen Anstalt der LMU, für die technische Hilfe bei den Reaktionen und die Unterstützung bei der technischen Fertigstellung der Arbeit.

Gleich in zweifacher Weise gilt mein ganz besonderer Dank Herrn PD Dr. Dr. R. Bals (früher Anatomische Anstalt, Lehrstuhl II, der LMU, jetzt Universitätsklinikum Marburg), und zwar sowohl für die Überlassung der Antikörper als auch für seine anhaltende und verständnisvolle Begleitung bei der Bearbeitung des Themas.

Vor allem aber gebührt mein Dank Herrn Prof. Dr. Dr. U. Welsch für seine stets freundliche und geduldige Betreuung. Für seine Hilfestellungen bei der Interpretation und Diskussion bin ich ihm äußerst dankbar.

## Lebenslauf

Name : Lang, Christiane Irene  
Geburtsdatum: 24. Juni 1976  
Telefon: 0176/51534209

## Schulbildung

**1982-1986** Grundschule Aichach  
**1986-1995** Deutschherren-Gymnasium Aichach mit Abschluss Abitur

## Studium

**1995-2001** Studium der Humanmedizin, Ludwig-Maximilians-Universität München  
**09/1997** Physikum  
**08/1998** 1. Staatsexamen  
**09/2000** 2. Staatsexamen  
**2000-2001** Praktisches Jahr  
**11/2001** 3. Staatsexamen

## Beruf

**10/2001-** PJ-Tertial Chirurgie, Krankenhaus Pitié-Salpêtrière, Paris  
**09/2002** PJ-Tertial Innere, Krankenhaus Pitié-Salpêtrière, Paris  
PJ-Tertial Psychiatrie, Psychiatrische Klinik Nußbaumstraße, München  
**02/2002-** Ärztin im Praktikum in der Hämatologie/Onkologie des Städtischen  
**08/2003** Krankenhauses München-Neuperlach  
**08/2003-** Assistenzärztin in der Hämatologie/Onkologie/Nephrologie/Diabetologie des  
**05/2004** Zentralklinikums Augsburg  
**06/2004-** Assistenzärztin Innere Medizin Kreiskrankenhaus Schrobenhausen  
**jetzt**